

TRABAJO DE FIN DE GRADO
Grado en Ingeniería Química

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD PROTEICA DE LA DORADA
INFLUENCIADA POR LAS ENZIMAS**



Memoria y Anexos

Autor:	Carlota Oliver Luque
Director:	MariaPilar Almajano
Co-Director:	Isidoro Metón
Convocatòria:	Mayo 2018

Agradecimientos

Quiero agradecer el 99.9% de este proyecto y de todo lo bueno que esta carrera me traiga a mis padres, y se quedaría corto porque aún merecerían muchísimo más, pero aún no he aprendido a hacer milagros.

El pequeño porcentaje que me queda para agradecer/dedicar va destinado a tantísimas personas que me sabe mal dejarles con tan poco. Principalmente se lo dedico a mis dos grandes descubrimientos durante la universidad y que espero verme con ellos cuando seamos unos yayos con el pelo blanco y en patinete, Xavi y Gabi, mi pareja y LePack. Porque todo el mundo debería, en algún momento de su vida, experimentar la felicidad y seguridad que estas dos personas me aportan.

Otro pequeño porcentaje se lo dedico a todos aquellos amigos que he encontrado por el camino, a los que aún continúan conmigo y a los que por motivos varios ya no, porque todas las personas que he ido encontrando durante estos años me han aportado tantos momentos buenos, tanto conocimiento y tanta liberación y relax que no hay momentos malos que les hagan sombra.

Finalmente, a MariaPilar e Isidoro (y a todos los que me han ayudado en el laboratorio, especialmente Jonás) por dejar quitarme la espinita de trabajar en investigación biológica. Porque aunque he acabado admirando la ingeniería a otro nivel, poder haber formado parte de un equipo de investigación y trabajado con células me ha permitido quitarme algo que nadie debería llevar como carga, y es ese constante "y si..." que te hace dudar de las decisiones tomadas.

Glosario

ADN Ácido desoxiribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

ATP adenosina trifosfato

cADN Cadena codificante de ADN

CMV citomegalovirus

DMEM Dulbecco's modified Eagle medium

EDTA etilendiamina tetra acetato

G6Pasa glucosa-6-fosfatasa

HPRT

LB medio de cultivo Luria-Bertrani

Oligo Oligonucleótido

pb Pares de bases

kb Miles de bases

PBS tampón fosfato salino

PCR reacción en cadena de la polimerasa

RISC RNA-induced silencing complex

RT transcriptasa inversa o retrotranscriptasa

RT-qPCR PCR cuantitativa en tiempo real

dsARN ARN de doble bicatenario

mARN ARN mensajero

sh-ARN short hairpin ARN

TAE Tris-acetato-EDTA

Resumen

Debido a los problemas que están surgiendo en la acuicultura actualmente, causados por la escasez de pescado, este sector se ha visto en la necesidad de buscar alternativas a los piensos utilizados actualmente (cuya fuente de energía proviene de proteínas cárnicas de pescado).

En este proyecto se estudia el diseño de plásmidos capaces de inhibir la expresión de la Glucosa- 6 -Fosfatasa (G6Pasa), de manera que se pueda modificar la dieta de la Sparus Aurata (Dorada) y basarla en carbohidratos vegetales, evitando la aparición de la hiperglucemia que desarrollan consecuencia de una alta ingesta de carbohidratos.

Se han aplicado diversas técnicas para dicho estudio, que han permitido el diseño, la clonación y la transefección de los "constructos" diseñados, así como su estudio *in vivo* mediante cultivos celulares.

Se ha conseguido comprobar la correcta inhibición de la enzima, comprobando su funcionamiento en diversos ensayos. Además, se ha estudiado la tendencia de dicho efecto inhibitorio a medida que se aumentaba la cantidad de plásmido transfectado.

El resultado ha sido positivo, confirmando la obtención de un constructo plasmídico (pCpG · shARN₁) capaz de inhibir la expresión de la Glucosa- 6 -Fosfatasa . Se ha observado que la inhibición es proporcional a la concentración, llegando a un punto de saturación, en la que ésta es constante.

Resum

Degut als problemes que estan sorgint a la aquicultura actualment, causats per l'escassetat de peix, el sector aquícola s'ha vist en la necessitat de buscar alternatives als pinsos utilitzats actualment (la font d'energia dels quals ve de les proteïnes càrniques del peix).

En aquest projecte s'estudia el disseny de plasmidis capaços d'inhibir l'expressió de la Glucosa- 6- Fosfatasa (G6Pasa), de manera que es pugui modificar la dieta de la *Sparus Aurata* (Daurada) i basar-la en carbohidrats vegetals, evitant així l'aparició de la hiperglucèmia que aquestes desenvolupen a conseqüència de l'alta ingesta de carbohidrats.

S'han aplicat diverses tècniques per a aquest estudi, les quals han permès el disseny, la clonació i la transfecció dels "constructes" dissenyats, així com el seu estudi *in vitro* mitjançant cultius cel·lulars.

S'ha aconseguit comprovar la correcta inhibició de l'enzim, comprovant el seu funcionament en diverses assajos. A més a més, s'ha estudiat la tendència de la inhibició a mesura que s'augmentava la quantitat de plasmidi transfectat.

El resultat ha sigut positiu, confirmant l'obtenció d'un "constructe" plasmídic (pCpG·shRNA₁) capaç d'inhibir l'expressió de la Glucosa -6- Fosfatasa. S'ha observat que aquesta inhibició és proporcional a la concentració, arribant a un punt de saturació en el que aquesta es fa constant.

ABSTRACT

Due to the recent problems arising in the aquaculture sector, caused by the scarcity of fish, the aquaculture sector has had to look for alternatives to the feed currently used (whose source of energy comes from fish meat proteins).

In this project the design of plasmids capable of inhibiting the expression of Glucose 6 Phosphatase (G6Pasa) is studied, so that the diet of *Sparus Aurata* (Gilt- head bream) can be modified and based on vegetable carbohydrates, avoiding the appearance of hyperglycemia that develops as a result of a high intake of carbohydrates.

Various techniques have been applied for this study, which have allowed the design, cloning and transection of the designed constructs, as well as their in vitro study using cell cultures.

It has been possible to verify the correct inhibition of the enzyme, checking its functionality in various tests. In addition, the tendency of inhibition has been studied as the amount of transfected plasmid was increased.

The result has been positive, confirming the obtaining of a plasmid construct (pCpG · shRNA₁) capable of inhibiting the expression of Glucose 6 Phosphatase. It has been observed that the inhibition is proportional to the concentration, reaching a point of saturation, in which it is constant.

Índice

RESUMEN	6
RESUM	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1.	16
INTRODUCCIÓN	16
1.1 BASE TEÓRICA.....	17
1.2 ANTECEDENTES	22
1.2.1 ACUICULTURA Y EL CRECIMIENTO POBLACIONAL	22
1.2.2 DIETA ACTUAL DEL PESCADO	26
1.2.3 RUTAS METABÓLICAS	28
1.2.4 ADAPTACIÓN A UNA DIETA RICA EN CARBOHIDRATOS.....	31
1.2.5 GRUPO DE INVESTIGACIÓN DEL DR. ISIDORO METÓN.....	32
1.2.6 SILENCIAMIENTO GÉNICO	32
1.3 OBJETIVOS	35
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	35
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
1.4 PLANIFICACIÓN EN EL LABORATORIO	36
CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
2.1 REACTIVOS.....	38
2.1.1 REACTIVOS Y KITS COMERCIALES	38
2.1.2 MAQUINAS.....	40
2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	40
2.2.1 LISTADO DE PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS	40
2.2.2 MÉTODOS.....	42
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
3.1 OBTENCIÓN DE LOS CONSTRUCTOS PLASMÍDICOS PCPG-SHARN1, PCPG-SHARN2, PCPG-SHARN3 Y PCPG-SHARN4.....	62
3.2 OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO PCADN3-G6P	67
3.3 VALIDACIÓN DEL EFECTO SILENCIADOR DE LOS PLÁSMIDOS PCPG- SHARN1-4 SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA G6PASA DE DORADA MEDIANTE TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS EUCARIOTAS	80

CAPÍTULO 4. IMPACTO ECONÓMICO Y AMBIENTAL	91
4.1 IMPACTO ECONÓMICO.....	92
4.2 IMPACTO AMBIENTAL	98
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	101
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA.....	104
CAPÍTULO 7. ANEXOS	108

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figuras

Figura 1. Estructura del esqueleto del ADN <i>Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario. José Ramón Regueiro González. Ed. Médica Panamericana S.A</i>	17
Figura 2. Bases nitrogenadas que conforman el ADN. <i>Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario. José Ramón Regueiro González. Ed. Médica Panamericana S.A</i>	17
Figura 3. Síntesis de ADN continua (1) y discontinua (2). <i>Replicación del ADN. La información celular. J. L. Sánchez Guillén</i>	19
Figura 4. Crecimiento de la producción total de pescado comparado con el crecimiento poblacional en el período 1960-2016. Datos extraídos del Banco Mundial de Datos.	22
Figura 5. Comparación del crecimiento de la producción de pescado a partir de la pesca de captura y de la acuicultura en el período 1960-2016. Datos extraídos del Banco Mundial de Datos.	23
Figura 6. Porcentaje de capturas en base a la captura total de los países de EU-28 el año 2015 (Total: 5.144.219), No se tiene en cuenta en este total las regiones acuáticas de interior.	25
Figura 7. Esquema de anabolismo y catabolismo a partir de las diferentes macromoléculas (Lípidos, Polisacáridos y Proteínas). <i>Universidad Nacional de Salta. Tema XII: Vías metabólicas y de transferencia de energía.</i>	29
Figura 8. Ruta metabólica de la Glucosa. Glucolisis (catabolismo) y Glucogénesis (anabolismo). Imagen extraída de: <i>Apuntes de Biología General. Principales rutas metabólicas.</i>	30
Figura 9. Esquema del complejo de silenciamiento génico inducido(RISC) para una cadena de shARN. Traducido de: <i>MISSION™ shARN Library: Next Generation ARN Interference. Stephanie Uder, Henry George, Betsy Boedeker</i>	34
Figura 10. Esquema de los ensayos realizados en el laboratorio.	36
Figura 11. Esquema del proceso de amplificación por PCR. Imagen de: <i>Enzoklop - Own work, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32003643</i>	42
Figura 12. Ejemplo del resultado fotográfico de una electrofóresis de ADN en gel de agarosa. Imagen extraída de: https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-ADN-technology/ADN-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis	44
Figura 13. Montaje para electrofóresis de gel. Imagen extraída de: https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-ADN-technology/ADN-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis	45
Figura 14. Resultado electrofóresis tras la ligación de pCpG e insertos shRNAs. Tamaño esperado 150-200 pb.	64
Figura 15. Electrofóresis de Digestión Enzimática pCpG-shARNx usando como enzimas de restricción ACC651 y HindIII.	65
Figura 16. Amplificación G6Pasa por PCR a partir de MS1614F y MS1615R.	68

Figura 17. Electroforesis de gel tras ligación de inserto PGem-T-Easy y G6Pasa. Placa 1. Tamaño esperado: 1300 pb Aprox.	70
Figura 18. Electroforesis de gel tras ligación de inserto PGem-T-Easy y G6Pasa. Placa 1. Tamaño esperado: 1300 pb Aprox.	71
Figura 19. Electroforesis de gel tras ligación de inserto PGem-T-Easy y G6Pasa. Placa 1. Tamaño esperado: 1300 pb Aprox.	72
Figura 20. Digestión enzimática por EcoR1 de la placa 1 y 2. Tamaño esperado de <1200> y <5400> pb. Placa 1: <1>, <8>, <11>, <16>, <19> y <28>. Placa 2: <2> y <10>. El color rojo de esta foto es debido al contraste de la fotografía en el momento de hacer la captura.	74
Figura 21. Digestión enzimática por EcoR1 de la placa 3. Tamaño esperado de <1200> y <5400> pb.	74
Figura 22. Pre y Post corte de la sección de gel que contenía la G6Pasa.	76
Figura 23. Comprobación final del tamaño de pcADN ₃ y G6P. Tamaño pcADN ₃ : 5,4kb ; Tamaño G6Pasa: 1,25kb	76
Figura 24. Electroforesis de <i>PCR screening</i> de la ligación pCADN ₃ -G6Pasa. Tamaño esperado 1,3kb Aprox. Muestras seleccionadas: <3>, <5>, <7>, <11>, <12>, <18>, <21>, <23> y <24>....	78
Figura 25. Digestión enzimática de pcADN ₃ -G6Pasa para la comprobación de su composición. Tamaños esperados: G6Pasa 1200 pb; pCADN ₃ 5,2 kb.	79
Figura 26. Ensayo 1. Amplificación de HPRT mediante los oligonucleótidos JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs.	82
Figura 27. Ensayo 1. Amplificación de la Glucosa- 6 -Fosfatasa y CMVB mediante los oligonucleótidos CO1701 y CO1702 (G6Pasa) y JDRTpcmvBAS y JDRTpcmvBs (CMVB). ..	83
Figura 28. Ensayo 1. Normalización de la Glucosa- 6 -Fosfatasa.	85
Figura 29. Ensayo 1. Normalización de resultados de G6Pasa con HPRT y CMVB. Normalización total.	86
Figura 30. Ensayo 2: Normalización de la Glucosa- 6 -Fosfatasa	87
Figura 31. Ensayo 2. Normalización de resultados de G6Pasa con HPRT y CMVB. Normalización total.	87
Figura 32. Ensayo 3: Normalización de la Glucosa- 6 -Fosfatasa	89
Figura 33. Ensayo 3: Normalización de resultados de G6Pasa con HPRT y CMVB. Normalización total.	89
Figura 34. Distribución de costes para presupuesto de proyecto.	94
Figura 35. Mapa del plásmido pGem - T -Easy. Imagen extraída de: https://www.fishersci.ca/shop/products/promega-pgem-t-pgem-t-easy-vector-systems-4/p-127641	111
Figura 36. Mapa del plásmido pcADN ₃ . Imagen extraída de: https://www.addgene.org/75142/	112
Figura 37. Mapa del plásmido pcADN ₃ con la posición exacta de las enzimas de restricción. Imagen extraída de: https://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2092/	113
Figura 38. Instrucciones diseño de shARNs mediante herramientas bioinformáticas. Paso 1. ..	114
Figura 39. Instrucciones diseño de shARNs mediante herramientas bioinformáticas. Paso 2. ..	115
Figura 40. Instrucciones diseño de shARNs mediante herramientas bioinformáticas. Paso 3. ..	115
Figura 41. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la G6Pasa a partir de herramientas bioinformáticas. Paso 1.	116
Figura 42. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la G6Pasa a partir de herramientas bioinformáticas. Paso 2.	117
Figura 43. Ejemplo de secuenciación.	118

Tablas

Tabla 1. Reactivos y la empresa proveedora así como su aplicación específica.	38
Tabla 2. Enzimas de restricción empleadas en este proyecto, así como la empresa proveedora.	39
Tabla 3. KITs comerciales para el tratamiento del ADN y ARN empleados, empresa proveedora y abreviatura para este documento.	39
Tabla 4. Equipos(más destacados) empleados para el tratamiento de las muestras y proceso en el que participan. Los equipos restantes empleados para procesos intermedios se encuentran en el apartado <i>Capítulo 7. Anexos (Presupuestos)</i>	40
Tabla 5. Plásmidos empleados para la elaboración de los constructos finales deseados, así como su aplicación general.	40
Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados y su descripción breve de su uso y secuencia. Específicos para la G6Pasa.	41
Tabla 7. Oligonucleótidos específicos de los plásmidos con los que se ha trabajado.	41
Tabla 8. Reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de Reacción en cadena de polimerasa (PCR).	43
Tabla 9. Soluciones para la preparación del gel de agarosa y soluciones para su visualización con UV.	45
Tabla 10. Mezcla para la reacción de Ligación Vector·Inserto.	46
Tabla 11. Soluciones para la preparación de células competentes.	47
Tabla 12. Reactivos para la preparación de Placas LB-Agar.	48
Tabla 13. Reactivos para la preparación de medio LB.	49
Tabla 14. Esquema de la mezcla necesaria para llevar a cabo la digestión enzimática.	51
Tabla 15. Esquema de la mezcla necesaria para llevar a cabo la hibridación de los oligonucleótidos (shARNs).	52
Tabla 16. Soluciones preparadas para el mantenimiento de las células.	55
Tabla 17. Reactivos empleados para la preparación de los plásmidos para transfección.	58
Tabla 18. Preparación de mezcla para Retrotranscripción.	59
Tabla 19. Preparación muestra para estudio por qPCR.	59
Tabla 20. Preparación de la mezcla para la Ligación y concentraciones obtenidas tras ella.	62
Tabla 21. Características del vector y cada uno de los insertos a ligar. Mezcla para la ligación de ambos.	62
Tabla 22. Cantidades para la amplificación de los shARNs de 15µL y número de ciclos y temperaturas para dicho proceso donde: Des: Temperatura de desnaturalización; Al: Temperatura de alineamiento; Ex: Temperatura de extensión. Primera y última temperatura son de acondicionamiento.	63
Tabla 23. Concentraciones obtenidas de pCpG-shARNx tras la <i>Midiprep</i>	65
Tabla 24. Preparación Digestión enzimática pCpG-shARNx según enzimas de restricción pCpG (ACC651 y Hind III).	65
Tabla 25. Cantidades para la amplificación de la G6Pasa en <i>Ependorffs</i> de 150 µL y número de ciclos y temperaturas para dicho proceso donde: Des: Temperatura de desnaturalización; Al: Temperatura de alineamiento; Ex: Temperatura de extensión. Primera y última temperatura son de acondicionamiento. En este caso, debido a que se prepara una mezcla para futura purificación, las cantidades de TaqPol se han modificado añadiendo 0,05 µL por cada 25 µL de mezcla extras para aumentar la eficacia de dicha enzima.	67
Tabla 26. Concentraciones de G6Pasa tras amplificación.	68
Tabla 27. Cantidades para la amplificación del conjunto pGem - T - Easy · G6Pasa en <i>Ependorffs</i> de 15µL, y número de ciclos y temperaturas para dicho proceso donde: Des: Temperatura de desnaturalización; Al: Temperatura de alineamiento; Ex: Temperatura de extensión. Primera y última temperatura son de acondicionamiento.	69

Tabla 28. Concentraciones de las muestras que presentan la posibilidad de ser el plásmido construido pGem - T - Easy · G6Pasa.	73
Tabla 29. Resumen de mezcla para la Digestión Enzimática del conjunto vector - inserto pGem - T - Easy y G6Pasa.	73
Tabla 30. Digestión enzimática paralela de pCADN3 y conjunto pGem-T-Easy·G6Pasa para comprobación de tamaño y posterior corte de gel de pGem-T-Easy·G6Pasa.....	75
Tabla 31. Cantidades para la amplificación del conjunto pcADN ₃ · G6Pasa en Ependorffs de 15µL, y número de ciclos y temperaturas para dicho proceso donde: Des: Temperatura de desnaturalización; Al: Temperatura de alineamiento; Ex: Temperatura de extensión. Primera y última temperatura son de acondicionamiento.....	77
Tabla 32. Concentraciones obtenidas tras la <i>Miniprep</i> realizada los cultivos de posible conjunto PcADN ₃ ·G6Pasa.	78
Tabla 33. Mezcla para la digestión enzimática de los posibles conjuntos PcADN ₃ ·G6Pasa.	79
Tabla 34. Cantidad de plásmido añadido en las diferentes transfecciones realizadas.	80
Tabla 35. Ensayo 1: Cantidades de plásmido transfectadas en cada uno de los replicados.	85
Tabla 36. Ensayo 2: Cantidades de plásmido transfectadas en cada uno de los replicados.	86
Tabla 37. Ensayo 3: Cantidades de plásmido transfectadas en cada uno de los replicados.	88
Tabla 38. Clasificación post-hoc (método Scheffé) para $p < 0,05$	90
Tabla 39. Resumen de costes proyecto.....	93
Tabla 40. Porcentaje de producto para una ración de comida.	95
Tabla 41. Coste de la materia prima para la elaboración de pienso para la alimentación de una dorada.....	96
Tabla 42. Cantidad de producto para la alimentación de 1000 doradas durante un mes. 3 veces por día.	96
Tabla 43. Cantidad y coste para la cría de 1.000 doradas.	97
Tabla 44. Kg de cada producto para la alimentación de 1.000.....	98
Tabla 45. Resultados Ensayo 1. Amplificación con oligonucleótidos específicos de CMVB.	119
Tabla 46. Resultados Ensayo 1. Amplificación con oligonucleótidos específicos de HPRT.	120
Tabla 47. Promedio geométrico de los CT de HPRT y CMVB y resultados de la amplificación de la G6Pasa con sus oligonucleótidos específicos.....	121
Tabla 48. Normalización de los valores de la amplificación de la G6Pasa.....	122
Tabla 49. Normalización total de la amplificación de la G6Pasa.....	123
Tabla 50. Resultados Ensayo 2. Amplificación con oligonucleótidos específicos de CMVB.	124
Tabla 51. Resultados Ensayo 2. Amplificación con oligonucleótidos específicos de HPRT.	125
Tabla 52. Promedio geométrico de los CT de HPRT y CMVB y resultados de la amplificación de la G6Pasa con sus oligonucleótidos específicos.....	126
Tabla 53. Normalización de los valores de la amplificación de la G6Pasa.....	127
Tabla 54. Normalización total de la amplificación de la G6Pasa.	128
Tabla 55. Resultados Ensayo 3. Amplificación con oligonucleótidos específicos de CMVB.	129
Tabla 56. Resultados Ensayo 1. Amplificación con oligonucleótidos específicos de HPRT.	130
Tabla 57. Promedio geométrico de los CT de HPRT y CMVB y resultados de la amplificación de la G6Pasa con sus oligonucleótidos específicos.....	131
Tabla 58. Normalización de los valores de la amplificación de la G6Pasa.....	132
Tabla 59. Normalización total de la amplificación de la G6Pasa.....	133
Tabla 60. Desglose del coste de los equipos.	135
Tabla 61. Desglose del coste de los reactivos, KITS, enzimas y oligonucleótidos.....	137
Tabla 62. Desglose de coste de servicios y personal.....	139

Capítulo 1.

Introducción

1.1 Base teórica

Para facilitar la comprensión de todos aquellos procesos que se desarrollan durante los experimentos, así como las bases teóricas que se han tomado como base para realizarlos, se realizará a continuación un breve resumen de los conceptos biológicos y biotecnológicos que resulten necesarios.

ADN y características

El ADN es un polímero lineal formado por cuatro monómeros distintos. Su estructura se compone por un esqueleto fijo del cual sobresalen distintos sustituyentes. Este esqueleto está constituido por unidades repetitivas de azúcar-fosfato, tal y como se muestra en la *Figura 1*. Los azúcares son moléculas de desoxirribosa, dando nombre así al ADN (Ácido Desoxirribonucleico). Cada azúcar está unido a dos grupos fosfato mediante diferentes enlaces y se encuentran orientados de igual manera, haciendo que cada hebra de ADN sea polar con un extremo diferenciado del otro. (Introducción a la biología celular; Bruce Alberts, Dennis Bray).

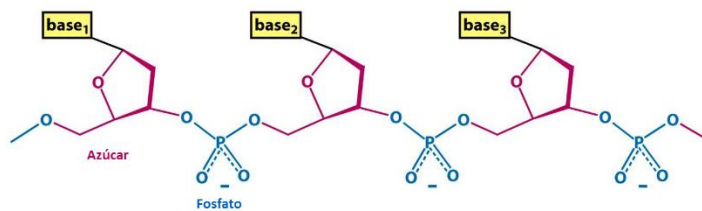


Figura 1. Estructura del esqueleto del ADN *Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario. José Ramón Regueiro González. Ed. Médica Panamericana S.A*

A cada desoxirribosa se puede unir una de las bases nitrogenadas recogidas en la *Figura 2*.

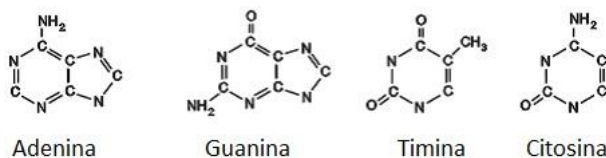


Figura 2. Bases nitrogenadas que conforman el ADN. *Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario. José Ramón Regueiro González. Ed. Médica Panamericana S.A*

Las moléculas de ADN poseen dos hebras (antiparalelas y complementarias¹). Esta estructura consiste en un doble helicoide formado por las dos hebras “superenrolladas”, donde el esqueleto azúcar-fosfato se encuentra en el exterior y las bases en el interior. La base de esta estructura reside en que se forman pares de bases específicos unidos por puentes de hidrógeno, los cuales son más débiles que los enlaces covalentes (carbono-carbono o carbono-nitrógeno). Cada 20 enlaces de puentes de hidrógeno equivalen a un enlace covalente. (Introducción a la biología celular; Bruce Alberts, Dennis Bray)

La secuencia de estas bases nitrogenadas a lo largo de la hebra puede almacenar información genética que determinará posteriormente la secuencia del Ácido ribonucleico o ARN y de las proteínas que realizan las actividades dentro de la célula.

Replicación del ADN

Las células eucariotas, como cualquier organismo vivo, pasan por distintas etapas durante su ciclo vital y, al final de éste, se dividen para organizar nuevas células hijas o bien se mueren. Durante la división de las células se lleva a cabo la duplicación semiconservativa del ADN. (Biología celular y molecular; Harvey Lodish)

La replicación se inicia en diferentes puntos de la molécula a la vez y progresa en ambas direcciones formando los llamados “ojos de replicación”. En primer lugar se separan las dos hebras y, una vez separadas, van entrando los nucleótidos complementarios de cada una de las hebras originales del ADN. Este proceso se realiza de diferente manera para una hebra que para otra (Jesús Merino Pérez y María José Noriega Borge, Apuntes Universidad de Cantabria):

²**Hebra 5' → 3'**: El ADN polimerasa, una de las enzimas que unen los nucleótidos, elonga la cadena en la dirección propia de la cadena a partir de un primer o fragmento de ARN que después es eliminado.

Hebra 3' → 5': Esta hebra no se replica en el sentido 3' – 5', sino que se replica discontinuamente en dirección 5' – 3'. Los diferentes fragmentos sintetizados (fragmentos *Okazaki*) son posteriormente unidos entre sí. Para realizar dicho proceso, se parte de un fragmento de ARN (*primer*), a partir del cual se sintetiza el ADN, en

¹ **Complementaria**: las bases de cada cadena se aparean de forma complementaria Adenina con Timina (A-T) y Citosina con Guanina (C-G). **Antiparalela**: una cadena está colocada en posición 5'- 3' y la complementaria en posición 3'- 5' (el ' indica el número del átomo de carbón en el azúcar).

² Información extraída de <https://www.ucm.es/data>

dirección 5' – 3'. Al llegar el primer a otro fragmento sintetizado, este ARN es degradado y se rellena el hueco con ADN. De esta manera, la síntesis es discontinua ya que se va sintetizando por fragmentos y luego éstos se unen entre sí.

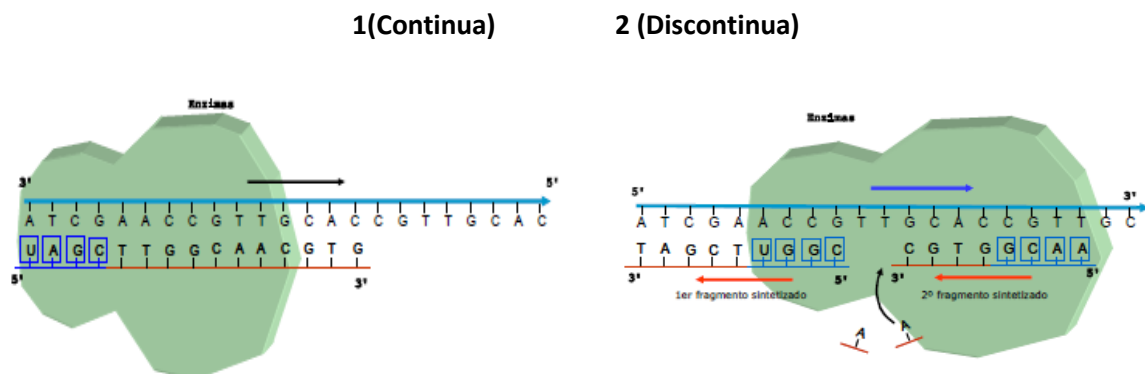


Figura 3. Síntesis de ADN continua (1) y discontinua (2). *Replicación del ADN. La información celular. J. L. Sánchez Guillén*

Transcripción

Como se ha mencionado anteriormente, la cadena de ácidos nucleicos determinará una secuencia de ARN específica. Dentro del ARN existen diferentes tipos según su función (RNA and DNA Diagnostics):

ARN mensajero (mARN): Molde para la síntesis de proteínas o traducción.

ARN de transferencia (tARN): Transporta los aminoácidos (componente básico de las proteínas) en forma activada al ribosoma para la formación de enlaces peptídicos en una secuencia dictada por el mARN molde. Hay, al menos, un tipo de tARN para cada uno de los 20 aminoácidos.

ARN ribosómico (rARN): Componente principal de los ribosomas. Desempeña un papel tanto catalítico como estructural en la síntesis de proteínas.

ARN nuclear pequeño (snARN): Participa en el empalme de los exones³ de ARN.

MicroARN (miARN): No codificadoras que se unen a las moléculas de mARN complementarias e inhiben su traducción.

³ **Exones:** Un exón es la porción de gen que codifica aminoácidos. En las células de plantas y animales, la mayoría de las secuencias de genes son alternadas por una o más secuencias de ADN llamadas *intrones*. Las partes de la secuencia de genes que contienen la información para producir las proteínas se llaman exones.

ARN pequeños de interferencia (siARN): Otra clase de moléculas pequeñas que se unen al mRNA y facilitan su degradación.

Short Herpin ARN (shARN): Molécula artificial de ARN con un pliegue sobre si misma que puede ser usada para silenciar la expresión de genes mediante ARNi.

La síntesis del ARN a partir del ADN está catalizada por la ARN polimerasa, que cataliza tanto la iniciación como la elongación de la cadena. Para ello, la ARN polimerasa requiere los siguientes componentes:

1. Un molde: ADN de doble hebra preferentemente, aunque también sirve ADN de hebra simple. El ARN de una o dos hebras no es un molde eficaz.
2. Precusores activados: Cuatro Ribonucleósidos trifosfato (ATP, GTP, UTP y CTP).
3. Ion metálico divalente.

La ARN polimerasa toma instrucciones de un ADN molde. Este ADN molde contiene regiones (secuencia específica de ADN) llamadas centros promotores que se unen específicamente a la ARN polimerasa y determinan donde comienza la transcripción. A partir del centro promotor se lleva a cabo la traducción. La ARN polimerasa discurre a lo largo del molde de ADN y transcribe una de sus hebras hasta alcanzar la secuencia de terminación. El resultado final será una cadena de ARN idéntica a la cadena codificante, es decir, a la cadena complementaria de la cadena molde, cambiando las Guaninas por Uracilos. (Farmacología y endocrinología del comportamiento; Manuel Sanchez).

En el caso de las células procariotas, el mRNA sufre modificaciones post-transcripcionales, eliminando los intrones (secuencias del genoma que no codifican nada) formando así el mRNA maduro que traducirá en proteínas. (Farmacología y endocrinología del comportamiento; Manuel Sanchez).

Traducción

La traducción del ARNm tiene lugar en los ribosomas y sigue los mismos pasos en procariotas y eucariotas. Cada triplete de nucleótidos o codón del ARNm determina un aminoácido específico. Cada molécula de ARNt porta el aminoácido correspondiente a un codón. El reconocimiento entre el ARNt y el codón tiene lugar gracias al anticodón. Entre los dos aminoácidos consecutivos debe formarse el enlace peptídico. Este paso está catalizado por la enzima Peptidil transferasa. Luego el ribosoma se desplaza a lo largo de la cadena peptídica

que se está formando y dejando un sitio vacante para un nuevo ARNt-aminoácido. La traducción continúa hasta que aparece un codón de terminación. Introducción a la biología celular; Bruce Alberts, Dennis Bray).

1.2 Antecedentes

1.2.1 Acuicultura y el crecimiento poblacional

Debido al rápido incremento de la población mundial en los últimos siglos uno de los problemas a los que se enfrenta la sociedad de hoy en día es al aumento de consumo alimentario *per cápita* y, por lo tanto, la crisis alimentaria que esto conlleva. Uno de los sectores afectados por este suceso es la pesca, ya que, según datos de la ONU (FAO 2016), su consumo ha aumentado entre el período 1961-2013 un 3,2% (Figura 4). Este dato, por sí solo ya podría definirse como concluyente, pero la verdadera problemática es que dicho consumo está creciendo más incluso de lo que lo hace la población, que en este mismo período ha sufrido un incremento del 1,6%. Estos incrementos se ven reflejados también en el consumo *per cápita* mundial, el cual, según datos de la misma investigación, tasan el aumento de kilogramos consumidos entre el 2001 y el 2013 de 16,1kg a 19,7kg por persona durante un año, alcanzando su record en 2014 con un consumo de 20kg.

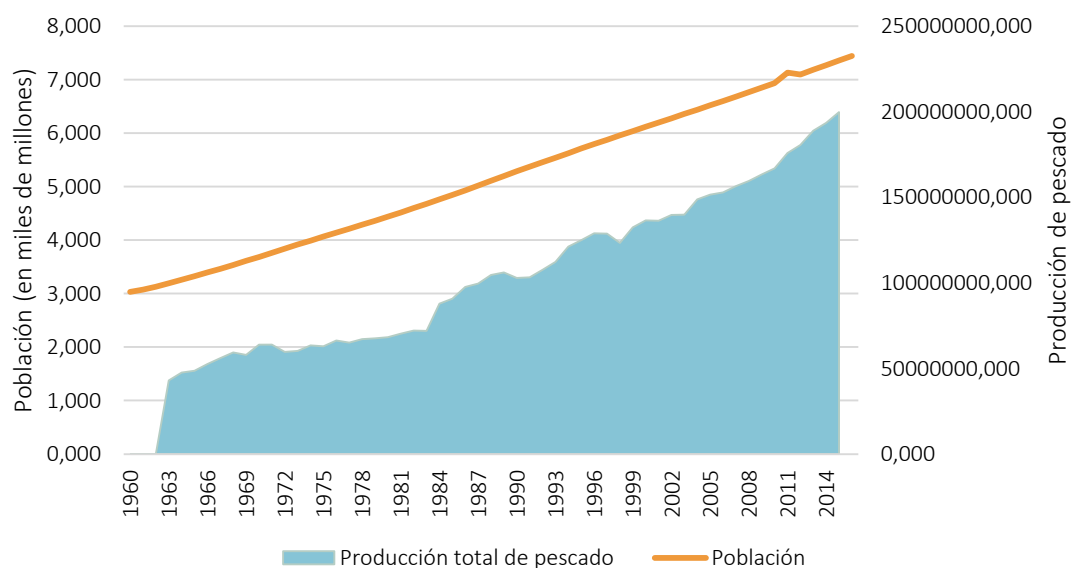


Figura 4. Crecimiento de la producción total de pescado comparado con el crecimiento poblacional en el período 1960-2016. Datos extraídos del Banco Mundial de Datos.

Uno de los motivos de este aumento de la producción de pescado se debe también a la continua investigación de sus ventajas nutricionales ya que, una porción de 150g de pescado puede proporcionar entre un 50% y un 60% de las necesidades proteicas diarias para un

adulto. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas, en 2010 el pescado representó un 16,7% del aporte de proteínas animales de la población mundial.

Este aumento del consumo ha tenido grandes repercusiones en la producción de este alimento. Como se puede observar en la *Figura 5*, desde mediados de 1980 la pesca de captura ha ido creciendo de manera exponencial, ganando terreno a la pesca salvaje, la cual se encuentra en un nivel de producción estática en 90-95 millones de toneladas desde mediados de los años noventa del siglo pasado (FAO 2016). La demanda adicional de este producto ha tenido que ser satisfecha por la producción acuícola, la cual presentó unos niveles de producciones mayores a la pesca de captura por primera vez en el año 2014. Cabe decir que estos valores no son puntuales y se prevee que dicha tendencia se haga más notable en el futuro. Según las previsiones (FAO 2016), el consumo de pescado en el mundo aumentará en 31 millones de toneladas en 2025 (un 8% respecto al período de referencia). Pero el crecimiento se verá realentizado debido al aumento de precio que se prevee en comparación con la carne.

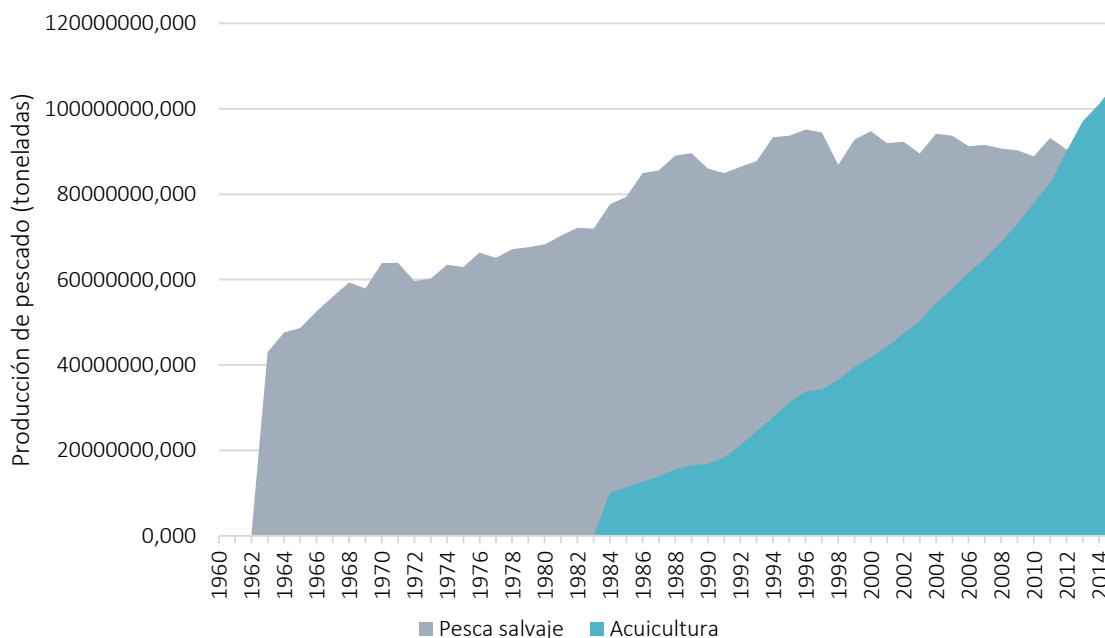


Figura 5. Comparación del crecimiento de la producción de pescado a partir de la pesca de captura y de la acuicultura en el período 1960-2016. Datos extraídos del Banco Mundial de Datos.

Mercado del pescado en la Unión Europea y España ⁴

Para completar los datos comentados hasta el momento y estudiar el papel de la pesca en España, hace falta analizar más detalladamente su producción, estudiando su papel en la Unión Europea y el estado actual de éste.

La base de datos del departamento de Pesca y Acuicultura de las Naciones Unidas (FAO 2015), así como el portal de datos estadísticos sobre la Unión Europea *Eurostat* realizan una división de la producción pesquera según el área. Las zonas pesqueras a las que legalmente abarcan los países que forman parte de la EU-28 son⁵:

- Atlántico, Noreste
- Atlántico, Noroeste
- Atlántico Centro-Este
- Mar mediterráneo y Mar Negro
- Atlántico Suroeste
- Atlántico Sureste
- Oceano Índico

Según dichas bases de datos (FAO 2015), la producción pesquera para toda la región E-28, en el año 2015, fue de 5112,6 miles de toneladas de pescado (de entre las cuales 1.312.920 toneladas fueron sólo de la región de Mar Mediterráneo y Mar Negro). En este caso también se observó un crecimiento (18%) respecto al año anterior, como en el caso global. Por otro lado, España presentó un crecimiento durante el período 2005-2015 de producción pesquera que le situó como el segundo país con mayor captura de Europa (901,5 miles de toneladas) y el número 20 a nivel mundial.

Este aumento de consumo está teniendo consecuencias en los dos sectores encargados de proveer el pescado a la sociedad:

Pesca salvaje

La pesca salvaje en Europa ha seguido la misma tendencia que la global. Llegando a su máximo en 1995 con 7,6 millones de toneladas pescadas, la captura total en EU-28 ha ido descendiendo hasta 2007. A partir de este año, se ha mantenido estable (a excepción de algunos años que ha mostrado picos de aumento o disminución de pesca). Finalmente, para

⁴ Todos los datos obtenidos para este apartado han sido recogidos del departamento de Pesca y Acuicultura de las Naciones Unidas (FAO 2015), así como el portal de datos estadísticos sobre la Unión Europea *Eurostat*.

⁵ Entre estos no se incluyen las regiones interiores de pesca (lagos, mares, ríos...) .

esta época, la pesca de este grupo de países era de 5,1 millones de toneladas, un 7,0% menos que el año de partida en esta comparación.

La pesca de España, Dinamarca, Reino Unido y Francia representó más de la mitad de la pesca total de todos los países miembros de la Unión Europea (58,1%). De los 23 países miembros de la UE con flota pesquera, 14 de ellos declararon una disminución de las toneladas pescadas en 2015 inferior a la de sus datos recogidos 10 años antes: Irlanda (-12,1%), Francia (-15,1%), Holanda (-33,3%) e Italia (-35,0%) por ejemplo. Por otro lado, Polonia, España y Reino Unido fueron las únicas regiones, cuya captura es superior a las 100 mil toneladas, las cuales sufrieron un aumento de las capturas del 42,3 %, 25,8% y 5,5% , respectivamente.

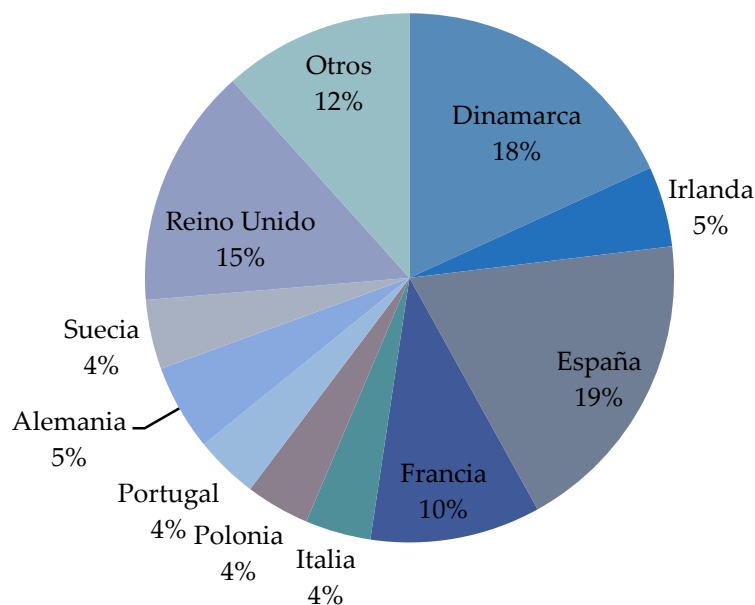


Figura 6. Porcentaje de capturas en base a la captura total de los países de EU-28 el año 2015 (Total: 5.144.219), No se tiene en cuenta en este total las regiones acuáticas de interior.

Acuicultura

En la mayoría los países pertenecientes a la EU-28, la acuicultura, durante el periodo 2004-2014, se ha mantenido prácticamente constante, con una producción que oscilaba entre 1,2-13 millones de toneladas. En España, por otro lado, la producción no se mantuvo constante, sino que ésta disminuyó ligeramente durante ese mismo período (FAO 2015).

A pesar de esta disminución, España ha seguido manteniéndose como el mayor productor acuícola de Europa. De hecho, en el año 2014, los países que destacaron en el sector de la acuicultura fueron España el primero, con 285 miles de toneladas producidas, seguida por Reino Unido, Francia, Italia y Grecia. La producción de este grupo de países supuso tres cuartos de la producción total de la EU-28. Ninguno de los países restantes produjo más de 100 mil toneladas de pescado (Datos estadísticos *Eurostat*).

1.2.2 Dieta actual del pescado

Una vez analizado el estado de la producción pesquera a nivel mundial, europeo y español, se observa como poco a poco la acuicultura está tomando un papel más importante en este sector, aumentando así la necesidad de comprender en que se basa. Para este proyecto, dicha necesidad reside en el estudio y entendimiento de la dieta que aplican a los peces en estas industrias.

En acuicultura, la alimentación de los peces (como por ejemplo la Dorada⁶) está basada en aceite de pescado y harina de pescado, sobretodo para los peces carnívoros y omnívoros, aunque también se ha hace uso de estas dietas para peces herbívoros, sobretodo en las primeras etapas del pez, donde necesitan ingerir altas cantidades de proteína (Robaina Robaina L. E, Izquiero López M. S, Moyano López J.; 1995).

- **Harina de pescado:** Es el producto obtenido a partir de la molturación y desecación de pescados enteros, de partes de éstos o de residuos de la industria conservera (a los que se se puede haber extraído el aceite).

El componente nutritivo más valioso de la harina de pescado es la proteína. Tiene una proporción ideal de aminoácidos esenciales altamente digestibles, que varía

⁶ Pez esencialmente carnívoro. Excepcionalmente puede alimentarse de algas y plantas marinas. (<http://www.doradas.es/la-dorada>)

relativamente poco con el origen de la harina. (FEADN: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal).

- **Aceite de pescado:** Originalmente, el aceite de pescado era un "segundo producto" de la fabricación de la harina de pescado, tras prensar y desecar los peces, el líquido de prensa se procesa para separar el aceite de pescado, el cual tras varios tratamientos de centrifugación y refinamiento, se envasa para su posterior consumo. Actualmente el aceite de pescado es un producto industrial de alto valor nutricional por su contenido de ácidos grasos omega-3 de cadena larga (DHA y EPA). Cabe destacar que éste se está volviendo muy importante en las dietas humanas también (considerado como aceite refinado), haciendo que la producción para la acuicultura compita a su vez con la comercialización del aceite para consumo regular humano. (Larrain, F. J. Z. (2002)

La producción mundial de la pesca para molturación ha oscilado entre los 18 millones y los 30 millones de toneladas (de 1976 a 2009). Después de alcanzar los 18,2 millones de toneladas en 1976, la producción de pesca para molturación aumentó progresivamente hasta los 30,2 millones de toneladas en 1994 y desde entonces ha ido disminuyendo de forma constante hasta los 17,9 millones de toneladas en 2009. Como consecuencia de ello, también se han registrado tendencias similares en la producción de harina y aceite de pescado. (FAO, 2011, Comité de Pesca, Subcomité de Acuicultura).

Con la disminución progresiva de la producción y la subida de los precios de los productos básicos comentados, uno de los objetivos del sector acuícola es encontrar sustituyentes para estas fuentes de proteínas más asequibles y sostenibles para reemplazar, parcial o totalmente, la harina de pescado y el aceite de pescado.

Alimentar los peces con dietas que no cumplan sus necesidades nutritivas no solo afecta a su crecimiento sino que también fomenta la aparición de enfermedades y la aparición de signos de deficiencia (comportamiento alterado y cambios patológicos). (Oliva-Teles, Enes y Peres, 2015)

Como se ha comentado, la dieta actual de los peces está basada en altas fuentes de proteínas, por lo que su metabolismo se encuentra adaptado a esta ingesta. La estructura de las proteínas está formada por grandes cadenas de aminoácidos, los cuales se clasifican en

esenciales o no esenciales según la capacidad que presenta el organismo para su síntesis o la necesidad de éstos en su dieta.

En general, los organismos emplean los aminoácidos para la síntesis de proteínas y, en menor medida, para la síntesis de otros compuestos. En el caso de los peces carnívoros, éstos emplean las proteínas también como fuente de energía, presentando así un metabolismo adaptado a emplear los aminoácidos como principal sustrato energético y gluconeogénico (Ballantyne, 2001).

Para facilitar la comprensión del metabolismo de los peces, se ha considera necesario primero la comparación de este método con el del ser humano, para introducir aquellos componentes que forman parte de las rutas y de las fuentes de energía de estos.

1.2.3 Rutas metabólicas

Una función importante de algunos nutrientes, concretamente los macronutrientes, hidratos de carbono, grasas y proteínas, es la de suministrar la energía necesaria para permitir el funcionamiento del organismo.

Sin embargo, los tejidos no pueden utilizar directamente la energía contenida en las citadas macromoléculas nutricionales. Por ello, los macronutrientes deben sufrir distintos procesos metabólicos para producir finalmente una molécula única, el Adenosín trifosfato (ATP), en cuyos enlaces se almacena parte de dicha energía. Posteriormente, este compuesto es el que suministra energía para cualquier trabajo celular. Los dos enlaces pirofosfato que contiene producen una gran cantidad de energía cuando se hidrolizan (y la necesitan igualmente para formarse). (Libro: Bioquímica: Conceptos esenciales, 2011)

Este conjunto de intercambios y transformaciones de materia y energía recibe el nombre de metabolismo y comprende dos tipos de reacciones: oxidación de las moléculas complejas y eliminación de productos de desecho con liberación de energía, y la biosíntesis de sustancias propias, a partir de moléculas sencillas, con consumo de energía. Todas estas reacciones tienen lugar en el interior de las células del organismo. Estas reacciones se separan en catabolismo (pasar de una macromolécula a una sustancia más simple, liberando energía) y anabolismo (a partir de sustancias simples se generan sustancias más complejas, como las

proteínas, que requiere energía extra para formar los enlaces. (Libro: Bioquímica: Conceptos esenciales, 2011)

Dentro del metabolismo se distinguen tres fases:

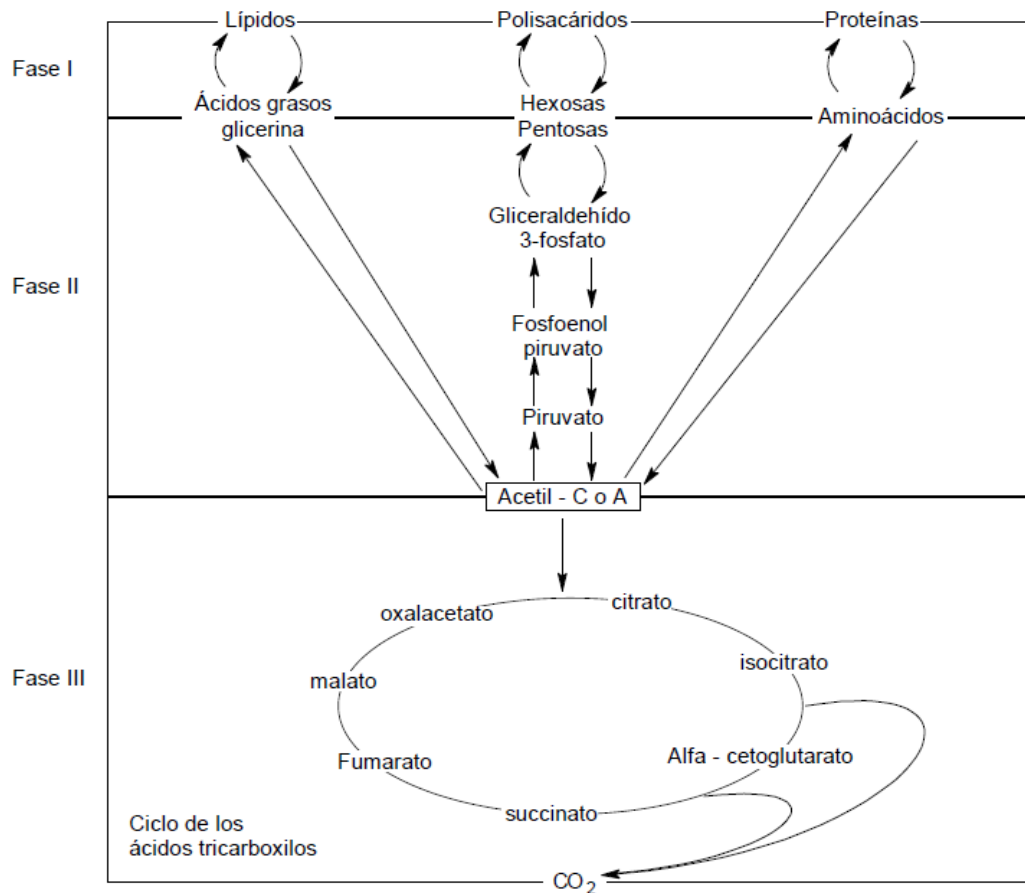


Figura 7. Esquema de anabolismo y catabolismo a partir de las diferentes macromoléculas (Lípidos, Polisacáridos y Proteínas). *Universidad Nacional de Salta. Tema XII: Vías metabólicas y de transferencia de energía.*

⁷**Fase I:** Relaciona las macromoléculas (proteínas, polisacáridos y triglicéridos) con las moléculas simples correspondientes (aminoácidos, hexosas, ácidos grasos y glicerol). Este proceso no precisa de energía.

Fase II: Relaciona estas moléculas simples con el acetil-CoA⁸. Mientras que las vías catabólicas de la fase II tienen un punto de convergencia que es la formación de acetil-

⁷ Información (Fases) extraída de: *Libro Bioquímica humana: curso básico*, Jose M. Macarulla, Félix M. Goñi

CoA, las vías anabólicas correspondientes muestran más diferencias. De hecho, sólo la biosíntesis de los ácidos grasos se realiza a partir de dicho acetil-CoA. Para los otros casos se puede establecer de manera simplificada que los precursores para la síntesis de glucosa y aminoácidos son el piruvato (procedente de la glucólisis) y algunos metabolitos del ciclo de Krebs (α -cetoglutarato y oxalacetato).

A pesar de que en el esquema de la *Figura 7* las vías catabólicas y anabólicas transcurren de forma paralela, en la realidad, a pesar de que algunas son reversibles y pueden funcionar en ambos sentidos, la mayoría de las etapas de las vías catabólicas y anabólicas están catalizadas por enzimas distintas. Para este proyecto, es de especial interés las enzimas que participan en la conversión a la Glucosa.

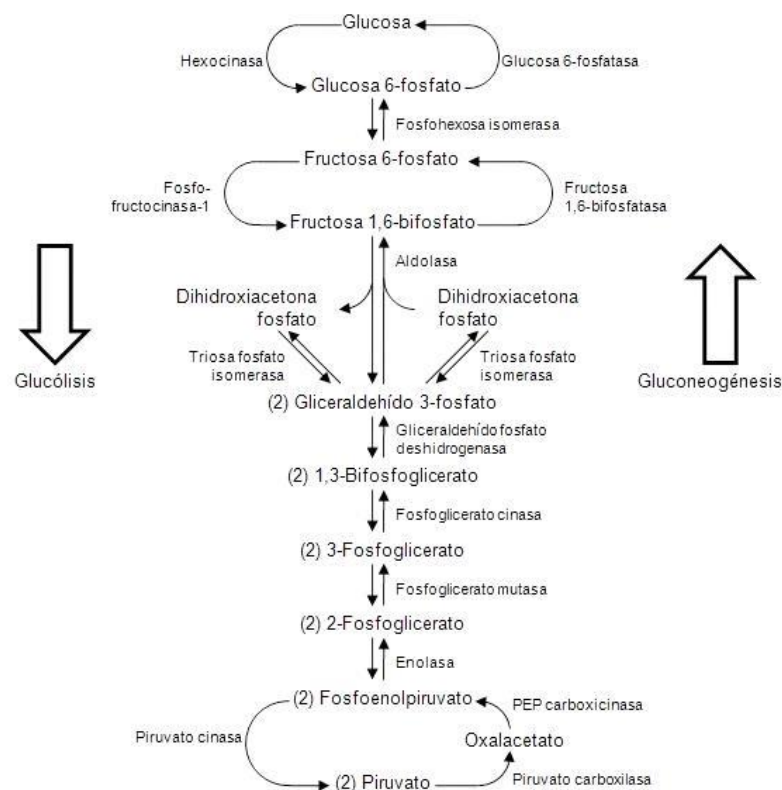


Figura 8. Ruta metabólica de la Glucosa. Glucólisis (catabolismo) y Glucogénesis (anabolismo). Imagen extraída de: *Apuntes de Biología General. Principales rutas metabólicas*.

⁸ El acetil-CoA es el producto común de la degradación de los principales combustibles metabólicos (polisacáridos, proteínas y lípidos). El grupo acetilo es degradado a CO₂ y H₂O vía el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa o utilizado para la síntesis de ácidos grasos.

Fase III: Está constituida por el metabolismo oxidativo del acetil-CoA, es decir, el ciclo tricarboxílico (ciclo de Krebs), cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. Desde el punto de vista catabólico, esta fase puede considerarse como la vía final común del aprovechamiento energético de todos los nutrientes. Se trata, en principio, de una vía exclusivamente catabólica e irreversible, aunque presenta ciertas excepciones.

En el caso de los humanos, la principal fuente de energía es la glucosa. Ésta ocupa una de las posiciones del metabolismo más importante, cuya reacción da lugar a la energía metabólica. Su especificidad en algunas de las células especializadas (neuronas, médula renal, córnea...) la convierte en imprescindible para las mismas y determina la necesidad de que tejidos específicos del cuerpo trabajen para asegurar el suministro adecuado.

En el caso de los peces, la obtención de energía viene dada por los aminoácidos, que provienen del catabolismo de proteínas corporales y proporcionan menos de la mitad de los aminoácidos que se requieren para formar proteínas en los peces. Por ello los peces resultan más dependientes de aminoácidos provenientes de la dieta que otros vertebrados. Desde el punto de vista energético, los aminoácidos son catabolizados para proveer ATP con fines biomecánicos, sintéticos y para procesos de transporte. En peces, los aminoácidos son la fuente de energía primordial comparado con los carbohidratos en los humanos (Cowey, 1994).

1.2.4 Adaptación a una dieta rica en Carbohidratos

Observando la tendencia de consumo mundial de pescado, y ante la necesidad de llevar la producción de pescado a niveles más económicamente viables y respetuosos con el medio ambiente, diversos grupos de investigación están trabando en la adaptación de la dieta de los peces a una rica en Carbohidratos. De esta manera, se propone adaptar la alimentación de los peces a una cuya materia prima sea más barata y, por otro lado, la reducción de relación proteína/energía en la dieta, mediante el suministro de nutrientes no nitrogenados, permitiría optimizar la retención de proteínas en peces y disminuir la excreción de compuestos nitrogenados al medio (Kaushik y Seiliez, 2010).

La capacidad que tienen las distintas especies de peces para aprovechar los carbohidratos de la dieta depende de los hábitos alimenticios en el entorno natural y por lo tanto de las

adaptaciones evolutivas del metabolismo que en este sentido han desarrollado (Wang et al., 2015). Por un lado, los peces omnívoros presentan mecanismos que les permite metabolizar la glucosa, aunque esta capacidad resulta ser menor que la encontrada en los mamíferos (Furuichi and Yone, 1981), mientras que los peces carnívoros poseen una capacidad marcadamente limitada para metabolizar carbohidratos, lo que se evidencia en la poca capacidad que tienen de regular los niveles de glucosa en sangre. En estos animales, tras la alimentación con dietas de un elevado porcentaje en carbohidratos o de la administración de glucosa, se observa intolerancia a la glucosa (incapacidad de tratar con la glucosa ingerida) y, como consecuencia, una marcada hiperglicemia que se mantiene por un tiempo prolongado, lo que en cierto sentido imita al comportamiento de la diabetes tipo 2 en humanos (Wright, Jr. et al., 1998; Moon, 2001).

1.2.5 Grupo de Investigación del Dr. Isidoro Metón

Ante la problemática presentada, el grupo de investigación liderado por el Dr. Isidoro Metón está llevando a cabo el estudio *in vitro* e *in vivo* de la adaptación de la especie *Sparus Aurata* (Dorada) a una dieta más rica en carbohidratos, disminuyendo así la ingesta de proteínas cárnicas que ésta precisa.

Para ello, el grupo valora en cada uno de los proyectos que desarrolla, la posibilidad de aplicar variaciones génicas temporales durante diferentes etapas del crecimiento de las doradas, con el objetivo de disminuir todos aquellos cambios que presenta su organismo durante la ingesta de carbohidratos que causarían una pérdida de interés en este producto para el mercado alimentario.

Debido a la dificultad legal que supone la modificación genética permanente de animales (animales transgénicos) y la reticencia que presentan ante la población, el grupo de investigación apuesta por una modificación génica temporal, en la que se estudia (previo a la aplicación *in vivo*) en qué momento de la alimentación se aplicarán estas modificaciones, así como el tiempo y la dosis a aplicar.

1.2.6 Silenciamiento génico

Uno de los descubrimientos punteros en la rama de la Biotecnología fue, hace aproximadamente dos décadas, la existencia de los ARNs de interferencia de pequeño tamaño

(siARN) y los microARN (miARN), ARNs de pequeño tamaño, no codificantes (no traducen a proteína), de gran importancia en la regulación de genes (J.K.W. Lam, M.Y. T. Chow, Y. Zang y S.W.S.Leung, 2015). Este hecho ha despertado el interés en el estudio de las moléculas de ARN bicatenarias (dsARN), las que se consideraban como el componente central del sistema de interferón (IFN) y una consecuencia de la replicación viral (MP Gantier, BRG Williams, 2007). El descubrimiento de estas pequeñas moléculas ha hecho que se estudie en más profundidad este suceso y las posibles aplicaciones en la inhibición de genes específicos.

En general, los dsARN presentes en las células (presentes ahí por la transcripción de genes propios, por infecciones patógenas o introducidos de manera artificial) son procesados en el citoplasma por una enzima especializada llamada Dicer. Ésta, al detectar la cadena de dsARN la segmenta en una más pequeña (21-31 nucleótidos) conocida como siARN, que activa el complejo de silenciamiento génico inducido(RISC). La endonucleasas argonauta 2 (AGO2), componente del sistema RISC separa la doble cadena y, mientras la cadena *reverse* se mantiene unida al sistema RISC, la cadena *forward* se une a la cadena de mRNA complementaria. La parte específica bicatenaria es degradada por la propia célula y, por lo tanto, silenciada y no traducida. (J.K.W. Lam, M.Y. T. Chow, Y. Zang y S.W.S.Leung, 2015).

En células de mamíferos, la adición de un dsARN exógeno largo (más de 30 nucleótidos) estaba asociado con la activación del mecanismo IFN (mecanismo de defensa para infecciones virales del propio cuerpo), generando una serie de respuestas celulares que llevaban a ésta a degradar el propio mRNA y una posterior apoptosis, es decir, a la muerte celular (S. Uder, H. George y B. Boedeker). A pesar de no conocerse en profundidad el mecanismo, diversos estudios *in vitro* en células de mamíferos, incluso humanas, han mostrado que la adición de una cadena exógena menor de siARN directamente (evitando el corte mediante Dicer) llevaba a cabo un silenciamiento más específico sin promover la activación de IFN. (J.K.W. Lam, M.Y. T. Chow, Y. Zang y S.W.S.Leung, 2015).

Alternativamente, se ha descubierto que la adición de *short harpin ARN* (shARN) unido a un viral desencadena la misma respuesta que estas dos moléculas comentadas. Su mecanismo, es prácticamente idéntico al de los siARNs:

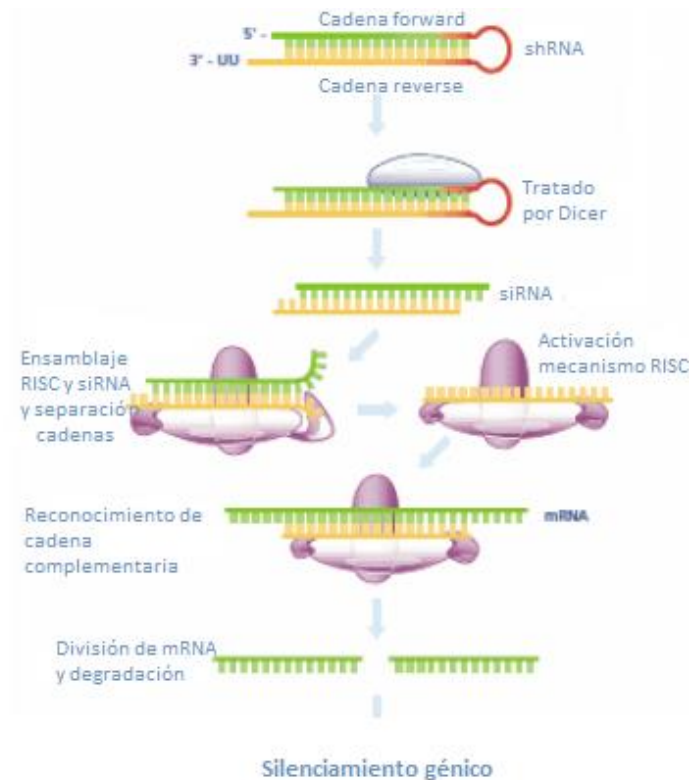


Figura 9. Esquema del complejo de silenciamiento génico inducido(RISC) para una cadena de shARN. Traducido de: *MISSION™ shARN Library: Next Generation ARN Interference*. Stephanie Uder, Henry George, Betsy Boedeker

Como se observa, este tipo de ARN crea una forma de horquilla ya que dos partes de la misma cadena son complementarias entre sí, uniéndose a si misma creando puentes de hidrógeno entre sus bases. De la misma manera, el sistema RISC separa ambas cadenas y, mientras una queda suelta, la otra se une al mRNA complementario, creando una cadena de mRNA con una sección bicatenaria que no será traducida a proteína.

Esta técnica es una de las empleadas por el grupo de investigación para poder disminuir los cambios padecidos por los peces ante la modificación de la dieta.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

En este proyecto se pretende inhibir, mediante la técnica de silenciamiento génico, la expresión de la *Glucosa-6-Fosfatasa*, enzima que participa en el proceso anabólico de la glucogénesis, encargada de catalizar la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato y, por lo tanto, generar la Glucosa. Mediante esta técnica se pretende reducir la aparición de la hiperglicemia de las Doradas ante una dieta rica en carbohidratos.

1.3.2 Objetivos Específicos

Para el estudio de inhibición de *Glucosa-6-Fosfatasa* (G6Pasa) en la dorada, es necesario cumplir los siguientes objetivos específicos y así asegurar el correcto desarrollo del proyecto:

1. Diseñar diferentes “constructos” plasmídicos capaces de inhibir la expresión de la G6Pasa.
2. Diseñar y clonar un “constructo” plasmídico capaz de sobreexpresar la G6Pasa de *S.Aurata* (Dorada).
3. Estudiar *in vitro* la capacidad de inhibición de los “constructos” plasmídicos.
4. Determinar cuál de los “constructos” diseñados es el más óptimo para el objetivo general establecido.

1.4 Planificación en el laboratorio

Para llevar a cabo este proyecto ha sido necesaria una previa planificación de cuáles serían los pasos a realizar durante el periodo de laboratorio. De esta manera se ha conseguido optimizar el tiempo y trabajar con margen suficiente para poder realizar el máximo de pruebas posibles en caso de imprevistos con la línea celular y los ensayos.

De manera resumida, se pueden agrupar los diferentes ensayos de la siguiente manera:

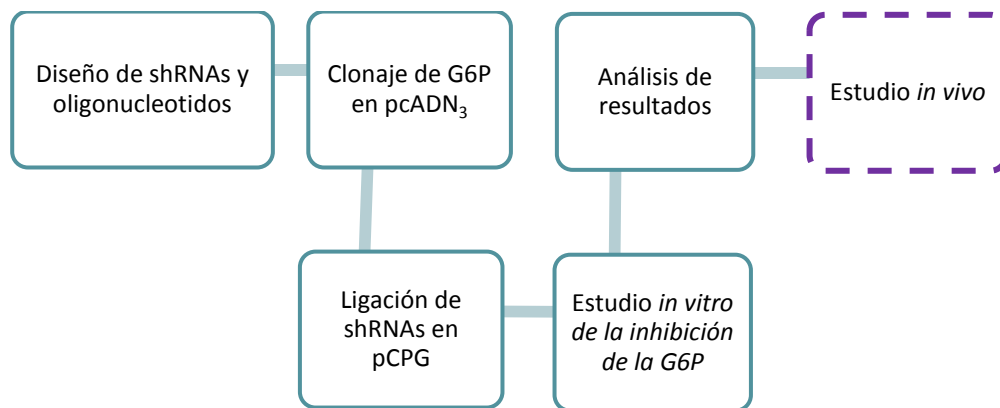


Figura 10. Esquema de los ensayos realizados en el laboratorio.

Una vez realizado este proyecto y obtenido el plásmido adecuado, de acuerdo a las prioridades del equipo de investigación, se procederá (en un futuro) al estudio *in vivo*.

Capítulo 2. Material y métodos

2.1 Reactivos

2.1.1 Reactivos y KITs comerciales

Los reactivos y KITs comerciales empleados para el desarrollo de este proyecto están recogidos en la *Tabla 1*:

Tabla 1. Reactivos y la empresa proveedora así como su aplicación específica.

Reactivo	Empresa	Función
Agarosa de alta resolución	Ecogen	Preparación gel agarosa
RedSafe™	INtRON Biothecnology	Preparación gel agarosa
Tris	Sigma Aldrich	Preparación gel agarosa
Na ₂ EDTA	Sigma Aldrich	Preparación gel agarosa
Marcador ADN 1kb	Fermentas	Análisis gel agarosa
<i>Orange G</i>	Sigma-Aldrich	Análisis gel agarosa
Glicerol	Sigma –Aldrich	PCR y guardar células
ADN Polimerasa	Bitools	PCR
Tampón de reacción 10X	Bitools	PCR
100mM DNTPs Set	Invitrogen	PCR
T4 ADN Ligasa	Promega (USA)	Ligación
Tampón de Ligación Rápido 2X	Promega (USA)	Ligación
Tampón Tango 10X (con BSA)	Thermo Scientific	Digestión enzimática (siPCPG)
Yeast Extract	CONDA (Madrid)	Preparación LB
Tryptone	CONDA (Madrid)	Preparación LB
NaCl	Panreac (Barcelona)	Preparación LB
Tampón ECOR1		Digestión enzimática (pGem-G6P)
KCl	Sigma Aldrich	Preparación PBS (Cultivo celular)
Na ₂ HPO ₄	Panreac	Preparación PBS (Cultivo celular)
KH ₂ PO ₄	Panreac	Preparación PBS (Cultivo celular)
Tripsina	Thermo Fisher	Cultivo celular
DMEM	Sigma Aldrich	Preparación medio
Suero bovino	Fisher Scientific	Preparación Medio
Penicilina y Streptocina		Preparación Medio
Tryptan Blue	Roche	Contabilizar células
SYBR Green	Thermo Fisher	qPCR

BES	Thermo Fisher	qPCR
CaCl ₂	Panreac	qPCR
MgCl ₂	Sigma Aldrich	Células competentes
CaCl ₂	Sigma Aldrich	Células competentes

Tabla 2. Enzimas de restricción empleadas en este proyecto, así como la empresa proveedora.

Enzimas	Empresa	Proceso
ACC651	Thermo Fisher	Digestión enzimática
Hind III	Thermo Fisher	Digestión enzimática
EcoR I	Thermo Fisher	Digestión enzimática

Tabla 3. KITs comerciales para el tratamiento del ADN y ARN empleados, empresa proveedora y abreviatura para este documento.

KIT	Empresa	Proceso
GenElute TM Plasmid Miniprep KIT	Sigma Aldrich	Miniprep
GenElute TM Plasmid Midiprep KIT	Sigma Aldrich	Midiprep
High Pure ARN Isolation KIT	Roche	Extracción de ARN
High Pure PCR Product Purification KIT	Roche	Purificación

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados (*Tabla 6 y Tabla 7*) se han diseñado mediante herramientas bioinformáticas (*ANEXO 3: Diseño bioinformático de los oligonucleótidos y shARNs*) y posteriormente encargados a la empresa Sigma Aldrich. Dichos oligonucleótidos son enviados liofilizados y después de añadir Agua MiliQ (cantidades específicas de cada pedido) se obtienen las *muestras madres* que después se alícuotan en concentraciones inferiores (10mM).⁹

⁹ Los shRNAs no son alícuotados, se trabaja con 100mM.

2.1.2 Maquinas

Tabla 4. Equipos(más destacados) empleados para el tratamiento de las muestras y proceso en el que participan. Los equipos restantes empleados para procesos intermedios se encuentran en el apartado **Capítulo 7. Anexos (Presupuestos)**.

Máquinas	Proceso
Termociclador	PCR
Cámara de electrofóresis	Electróforesis
Espectrofotómetro UV	Células competentes
StepOne Plus	qPCR
Nanodrop	Determinación concentración
Kodak EDAS 290	Ánisis gel agarosa
Centrifugas	Mezcla de muestras
Baño termostático	Cultivo celular, digestiones enzimáticas...
Campana flujo laminar	Cultivo celular
Contador de células	Transfección

2.2 Procedimiento experimental

2.2.1 Listado de plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Tabla 5. Plásmidos empleados para la elaboración de los constructos finales deseados, así como su aplicación general.

Plásmidos ¹⁰	
pGem-T Easy	Vector que facilita la ligación de fragmentos de ADN obtenidos mediante amplificación por PCR.
pCpG	Vector diseñado para la expresión de shARNs.
pcADN3	Vector de expresión eucariota utilizado para la expresión y traducción

¹⁰ Mapa de restricción de cada plásmido adjunto en **ANEXO 2: Mapa de los plásmidos empleados**.

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados y su descripción breve de su uso y secuencia. Específicos para la G6Pasa.

Código	Secuencia
<i>Oligonucleótidos para la clonación de pcADN₃</i>	
MS1614F	CCAAGCTTACCATGGATCTTCTGCACAGCTGGG
MS1615R	CCGAATTCGCCAGCACAATCACTTCAGG
<i>Oligonucleótidos para la formación del plásmido pCPG·shARN₁</i>	
MS1606F	GTACCTCGGCTCAACCTGGTGTGAAATTCAGAGATTTCAGCACCAGGTTGAGCCTTTTGGAAA
MS1607R	AGCTTTTCCAAAAAGGCTCAACCTGGTGTGAAATCTCTTGAATTCAGCACCAGGTTGAGCCGAG
<i>Oligonucleótidos para la formación del plásmido pCPG·shARN₂</i>	
MS1608F	GTACCTCGCGTCTGGTATGTGATGGTCATCAAGAGTGACCATCACATACCAGACGCTTTTGGAAA
MS1609R	AGCTTTTCCAAAAAGCGTCTGGTATGTGATGGTCACTCTTGATGACCATCACATACCAGACGCGAG
<i>Oligonucleótidos para la formación del plásmido pCPG·shARN₃</i>	
MS1610F	GTACCTCGAAGGAGAAGTGGATCTACGATCAAGAGTCGTAGATCCACTTCTCCTCTTTTGGAAA
MS1611R	AGCTTTTCCAAAAAGAAGGAGAAGTGGATCTACGACTCTTGATCGTAGATCCACTTCTCCTTCGAG
<i>Oligonucleótidos para la formación del plásmido pCPG·shARN₄</i>	
MS1612F	GTACCTCGGAAGACAGAAGACAAGAACTTCAAGAGAGTTCTTGTCTTCTGTCTTCCTTTTGGAAA
MS1613R	AGCTTTTCCAAAAAGGAAGACAGAAGACAAGAACTCTTGAAGTTCTTGTCTTCTGTCTCCGAG
<i>Oligonucleótidos para qPCR de G6Pasa</i>	
CO1701	GCGTATTGGTGGCTGAGGTCTG
CO1702	AAGGAGAGGGTGGTGTGGAAG

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos de los plásmidos con los que se ha trabajado.

T7	Oligonucleótido específico para pGem - T - Easy y pcADN ₃ .
pGem - T - Easy rev	Oligonucleótido específico para pGem - T - Easy
pcADN₃ rev	Oligonucleótido específico para pcADN ₃
JDOL1604	Oligonucleótido para shARNs
JDRTPcmvbS	Oligonucleótido qPCR CMVB
JDRTPcmvbAS	Oligonucleótido qPCR CMVB
JDRTHPRTs	Oligonucleótido qPCR HPRT
JDRTHPRTAs	Oligonucleótido qPCR HPRT

El diseño de estos oligonucleótidos se ha hecho partiendo de la secuencia codificante de *Sparus aurata glucose -6 - phosphatase mRNA*. (Caseras,A., Vives,C., Meton,I. y Baanante,I.V,

2004). Tanto la secuencia como el proceso de diseño están especificados en el *ANEXO 1: Cadena completa de mARN Glucosa- 6 -Fosfatasa de Sparus Aurata*

2.2.2 Métodos

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR (Saiki ,1988) se utiliza para amplificar fragmentos de ADN a partir de un ADN molde (se obtienen 2^n copias a partir de una sola molécula bicatenaria, siendo n el número de ciclos que se aplican).

La zona de amplificación viene determinada por dos oligonucleótidos (*forward* y *reverse*) que son complementarios a una secuencia conocida. Estos oligos funcionan como cebadores para la síntesis de ADN (el uso de una ADN polimerasa termoestable permite que esta lleve a cabo ciclos sucesivos de síntesis de ADN).

El procedimiento consiste en someter la muestra a una temperatura tal ($94-96^{\circ}$) que permita romper los enlaces de puente de hidrogeno que mantienen unidos los dos polinucleotidos de doble cadena. Seguidamente se disminuye la temperatura de manera que los oligonucleótidos hibridan con sus secuencias complementarias. Estos, servirán como iniciadores para la síntesis de nuevas cadenas por parte de la ADN polimerasa (a 72°C en el caso de la enzima utilizada). El producto servirá como molde para la síntesis de las siguientes cadenas. (*Libro PCR: essential techniques. John Wiley & Sons*)

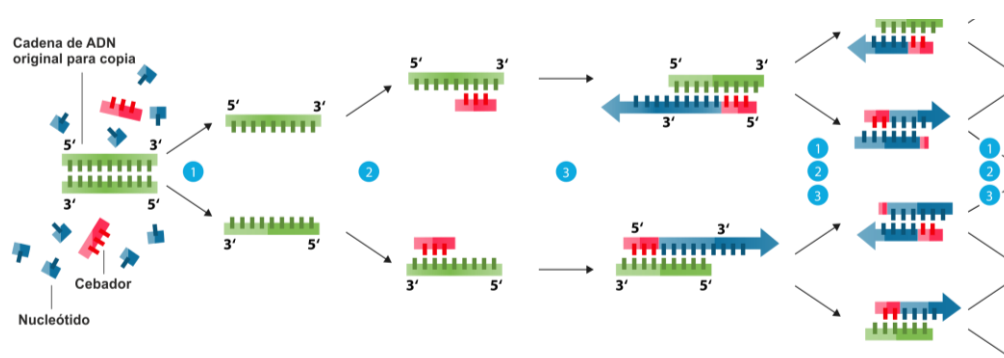


Figura 11. Esquema del proceso de amplificación por PCR. Imagen de: *Enzoklop - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32003643>*

1. Desnaturalización a $94 - 96^{\circ}\text{C}$
2. Alineamiento a $\approx 68^{\circ}\text{C}$
3. Extensión a 72°C

Reacción de PCR

Tabla 8. Reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Componente	Cantidad
cADN	0,5 µL
Tampón 10X	1,5 µL
<i>Thermus aquaticus</i> (polimerasa Taq)	0,09 µL
Oligonucleótido <i>forward</i>	0,2 µL
Oligonucleotido <i>reverse</i>	0,2 µL
dNTPs	
dATP	0,2 mM
dTTP	0,2 mM
dCTP	0,2 mM
dGTP	0,2 mM
H2O miliQ	Volumen reacción 15 µL

Según el procedimiento realizado, el programa de PCR (temperaturas, tiempo de cada proceso y número de ciclos) ha variado. Se especificará el programa utilizado para cada amplificación realizada en el apartado Resultados.

Electroforesis de ADN

Esta técnica permite llevar a cabo la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN aprovechando la carga negativa (debida a las uniones azúcar – fosfato) del propio segmento de ADN. De esta manera, al someter los fragmentos a una electroforesis a través de un medio de agarosa, estos son cribados según su tamaño (BeARNTzky 1988) y, mediante una relación inversa entre la distancia que recorre dicho fragmento y el logaritmo de su peso, se puede determinar los pares de bases de él. (Aaij C, Borst P., 1972)

Para la determinación del tamaño de los fragmentos con los que se ha trabajado durante este proceso se han usado geles de agarosa (1% p/v)¹¹ ya que, a pesar de tener una resolución menor que los de poliacrilamida, poseen mayor rango de separación (200bp-50kb de longitud) (Sambrook et al. 1989). Así mismo, se ha añadido RedSafe™ para la detección de los ácidos nucleicos (emite fluorescencia verde cuando se une al ADN). Finalmente, el marcador utilizado para determinar el tamaño de la muestra analizada es el *1 KB ladder*.

Preparación del gel de agarosa

1. Pesar la cantidad de agarosa según volumen total de gel de agarosa.
2. Disolver la agarosa en el volumen de TAE 1X calentando la muestra en el microondas.
3. Sellar el pórtateles tal y como se muestra en la *Figura 13*.
4. Añadir 5 µL de RedSafe™ (guardar la punta para su posterior uso)
5. Añadir la mezcla de agarosa y TAE 1X (aproximadamente un dedo) e incorporar el marcador y la mezcla utilizando la punta anteriormente guardada).
6. Colocar los peines para crear los pocillos donde ira la mezcla una vez solidificado el gel.
7. Dejar solidificar el gel a temperatura ambiente y retirar los peines una vez el gel esté listo.

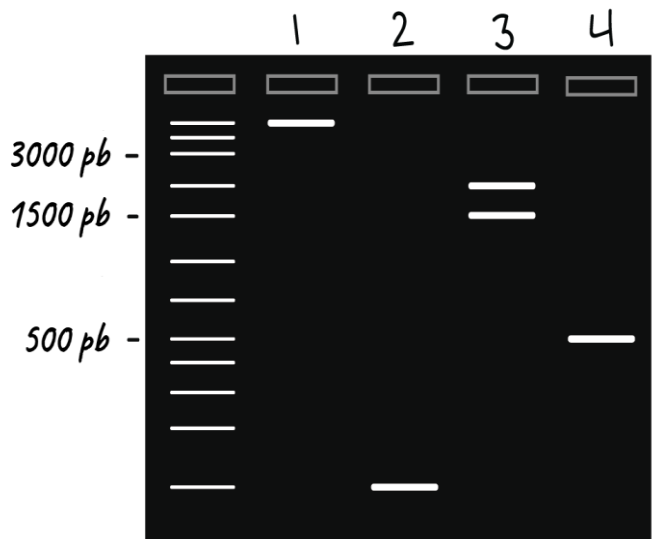


Figura 12. Ejemplo del resultado fotográfico de una electrofóresis de ADN en gel de agarosa. Imagen extraída de: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-ADN-technology/ADN-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>

¹¹ En determinados casos se ha empleado gel de agarosa 3% debido al pequeño tamaño de las muestras a analizar. Esto se especificará más adelante en Resultados.

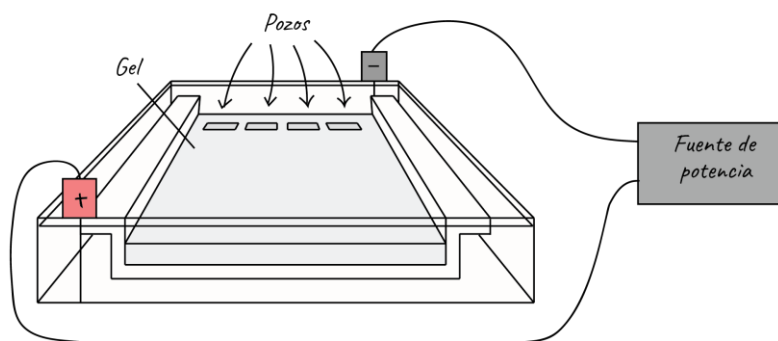


Figura 13. Montaje para electroforesis de gel. Imagen extraída de: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-ADN-technology/ADN-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>

Soluciones

Tabla 9. Soluciones para la preparación del gel de agarosa y soluciones para su visualización con UV.

Tampón electroforesis de ADN: TAE 50X	Solución de carga de muestras de ADN (6X)
<i>Tris HCl 2M</i>	<i>Glicerol 30%</i>
<i>NA₂EDTA· 2H₂O 100mM</i>	<i>Orange G 0,25%</i>
<i>Ácido acético glacial 57,1ml</i>	
Gel de Agarosa	
Agarosa	0,8 % - 2 % p/v
Buffer TAE 1X	100 mM
Red Safe	0,1 µl/ml

En cada pocillo se carga 1 µL de *Solución de carga de muestra de ADN (6X¹²)* y 5 µL de muestra a analizar (en el caso del 1 Kb ladder serán 6 µL de él mismo) y se aplicará una diferencia de potencial de 100V a temperatura ambiente.

Purificación de productos de PCR

Para llevar a cabo este proceso se ha utilizado un kit comercial (*High PCR Product Purification Kit* de Roche). Su procedimiento se basa en que, en presencia de Tiocianato de guanidina con Sal caotrópica, el ADN amplificado se une selectivamente a las fibras de vidrio. De esta manera, se introduce el producto de PCR en ese tubo con fibras y se somete a diversos lavados

¹² Tampón preparado para facilitar cargar la muestra en el gel de agarosa.

con reactivos específicos (incluidos en el KIT) para eliminar los cebadores, nucleótidos y sales contaminantes. Acompañando cada lavado con un proceso de centrifugación y descartando el sobrenadante. El resultado restante es el tubo con el ADN clonado en sus fibras, el cual es eluído mediante una solución baja en sal.

Ligación

Esta técnica consiste en la ligación de moléculas de ADN de origen diferente catalizada por la ADN *ligasa* mediante enlaces fosfodiéster entre los grupos 3' hidroxil y el 5' fosfato terminales. Esta reacción permite unir fragmentos de ADN de doble cadena con extremos Romos o cohesivos¹³ para formar moléculas de ADN recombinado. (*Apuntes Biología molecular aplicada UCM*)

En todas las ligaciones realizadas en este proceso se ha usado una relación plásmido/inserto 1:3 para disminuir la probabilidad de recirculación del vector.

Tabla 10. Mezcla para la reacción de Ligación Vector·Inserto.

Preparación Ligación	
Plásmido + inserto en proporción 1:3	4 µL
T4 ADN ligasa	1 µL
2X Rapid Ligation Buffer	5 µL
Total	10 µL

Procedimiento ligación

1. Realizar la mezcla indicada en la *Tabla 10*.
2. Incubar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Guardar la mezcla a 4°C durante la noche.

Obtención de células competentes

Debido a la dificultad que presenta la cepa *E.coli* para introducir ADN exógeno en su interior, es necesario someter las células a un tratamiento previo para hacerlas competentes. En este proceso se alteran las membranas (sobre todo la externa) y aumenta la permeabilidad al ADN.

¹³ **Cohesivos:** La enzima corta las dos hebras asimétricamente, dejando los extremos de cada hebra de cadena simple complementarios entre sí. **Romos:** La enzima corta las dos hebras por el mismo lugar, generando dos extremos doble cadena.

1. Sembrar una colonia de la cepa deseada en una placa de LB agar y dejar crecer toda la noche a 37°C con agitación.
2. Picar una colonia que haya crecido bien e en medio LB. Dejar crecer durante toda la noche en agitación y a 37°C.
3. Tomar una alícuota y introducirla en 50ml de LB. Dejar crecer a 37°C en agitación hasta que llegue a DO600 < 0,6-0,9 (Por encima de 1 empieza a saturarse).
4. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
5. Retirar el sobrenadante y re-suspender 50ml de MgCl₂ 100mM frío.
6. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
7. Retirar el sobrenadante y resuspender en 10ml de MgCl₂ 100mM frío y 100ml de CaCl₂ 100mM frío.
8. Dejar en hielo de 60 a 90min.
9. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
10. Retirar el sobrenadante y resuspender en 12,5 ml de *Solución de resuspensión*.
11. Alicuotar en *Eppendorffs* estériles y guardar a -80°C.

Soluciones

Tabla 11. Soluciones para la preparación de células competentes.

MgCl ₂ 100mM	CaCl ₂ 100mM
2,633g MgCl ₂ ·6H ₂ O	2,94g CaCl ₂ ·2H ₂ O
100ml H ₂ O	200ml H ₂ O

Transformación

Para conseguir la entrada del ADN deseado dentro de la cepa se debe primero realizar un estudio del gen de resistencia a los antibióticos del propio plásmido (mapa del plásmido). De esta manera se consigue hacer una criba de las colonias que crecerán en la placa ya que, aplicando el antibiótico, las células que no tengan resistencia a éste no crecerán (no todas ellas), obteniendo una placa llena de colonias, la mayoría de las cuales llevarán el plásmido. Aún así, será necesario comprobar la calidad de la transformación con diferentes tratamientos posteriores. Los dos antibióticos empleados en este proyecto han sido la *Ampicilina* y la *Zeocina*.

Preparación placas de agar LB

El proceso de transformación se lleva a cabo en placas de agar LB, las cuales, se deben preparar un par de días antes de su uso. Estas placas llevan a parte del agar LB una cantidad (proporcional a la del LB preparado) del antibiótico al que el plásmido presenta resistencia (siguiendo el mapa del plásmido).

1. Preparar el medio LB (con agar) correspondiente a las células que se quieren crecer y autoclavar.
2. Dejar que disminuya la temperatura para facilitar su manipulación.
3. En esterilidad, añadir la cantidad de antibiótico correspondiente.
4. Siguiendo en esterilidad, verter unos ml de la mezcla en cada placa.
5. Dejar que la mezcla solidifique y mantenerla en nevera.

Tabla 12. Reactivos para la preparación de Placas LB-Agar.

Placas de LB-Agar	
Triptona	1 %
Extracto de levaduras	0,5 %
NaCl	1 %
Agar Bacteriológico	1,5 %
Agua	Solvente

Transformación

1. En un *Eppendorf* estéril mezclar 50 μ L de células competentes y 0,5 μ L del plásmido en cuestión.¹⁴
2. Dejar la mezcla 15 minutos en hielo.
3. Pasar la muestra a choque térmico durante 2,5 minutos a 42°C.
4. Dejar en hielo durante 5 minutos.
5. En esterilidad, añadir 500 μ L de LB.
6. Dejar en el baño a 37°C durante 45 minutos.
7. Centrifugar la muestra durante 1 minuto.
8. Retirar, en esterilidad, parte del sobrenadante y resuspenderlo con el medio restante.
9. Sembrar las células en la placa de agar LB.
10. Guardar la placa en estufa durante toda la noche.

¹⁴ Estas cantidades dependerán según si se está trabajando con una ligación o con un plásmido.

PCR screening

Esta técnica se emplea para determinar cuáles de las colonias que han crecido en las placas transformadas son posibles positivas, es decir, tienen el ADN exógeno en ellas. Para ello, se lleva a cabo el mismo procedimiento que en el PCR pero en vez de usar ADN molde, se utiliza una de las colonias que han crecido en el procedimiento anterior, picando suavemente la colonia con una punta estéril e introduciendo la punta en la mezcla (dNTPs, oligonucleótidos...).

Una vez realizado este procedimiento, se realiza la respectiva comprobación con la electroforesis de gel y se compara si el ADN amplificado coincide con el deseado. La placa se guarda sella con *Parafilm* y se guarda en la nevera para su posterior utilización (con las colonias analizadas bien marcadas y enumeradas).

Cultivo

Para aumentar la cantidad de muestra, en este proyecto se han realizado cultivos (10 ml y 150 ml) de las colonias confirmadas como positivas. Para ello, en el medio de LB adecuado para el crecimiento de dichas colonias se añade la cantidad proporcional de antibiótico y se toma con una punta estéril la colonia que se quiere hacer crecer. Esta mezcla se deja en incubación y agitación a 37°C durante la noche.

Tabla 13. Reactivos para la preparación de medio LB.

Medio LB	
Tryptona	1 %
Extracto de levaduras	0,5 %
NaCl	1 %
Agua	Solvente

Obtención de ADN plasmídico (*Miniprep* y *Midiprep*)

Una vez ha pasado el tiempo necesario, se puede observar el crecimiento de las células porque el medio LB presenta cierto grado de turbidez (dependiendo del grado de crecimiento del cultivo). Seguidamente, se desea extraer el ADN de dichas células y, por lo tanto, se somete el producto a un tratamiento (*Miniprep* o *Midiprep* según la cantidad de cultivo preparado) que romperá las membrana de la célula y eliminará el máximo de membrana, componentes de la célula (exceptuando ADN) y demás contaminantes.

El principio de funcionamiento es el siguiente: Primero, se rompen las paredes de la célula con una solución de lisis especialmente preparada para ello (además de otras para parar la reacción ya que si la muestra está expuesta durante más de 2-3 minutos a esta solución empieza a degradarse). Seguidamente se centrifuga, obteniendo como pellet las paredes celulares y en el sobrenadante el ADN de interés (junto a otros componentes de la célula). Este sobrenadante se traspasa a un *Eppendorf* junto con un filtro de membrana de sílice, donde se unirá el ADN y se realizarán los correspondientes lavados (con reactivos incluidos en el KIT) hasta eludir el producto en otro *Eppendorf* con *Tampón de Elución (10mM Tris – HCl pH = 8.5)*.

Digestión enzimática

Un plásmido circular contiene en su interior dianas o sitios de restricción. Estas secuencias de bases son reconocidas por enzimas de restricción o endonucleasas y, mediante la hidrolización de un enlace fosfodiéster, cortan la secuencia. Este proceso se llama Digestión enzimática. El resultado final consiste en uno o dos plásmidos lineales (según si se ha cortado con una o dos enzimas de restricción). Dichas enzimas se obtienen de manera comercial.

Las dos funcionalidades que se le han dado a esta técnica han sido;

Comprobación: Es necesario en todo momento estar seguro del plásmido con el que se trabaja, que éste no haya sufrido ninguna mutación y que, en caso de ligación, contenga el inserto deseado. Se consigue determinar si dicho inserto ha sido ligado en su totalidad y en la posición deseada cortándolo por el extremo superior e inferior del inserto (siguiendo el mapa del plásmido – **ANEXO 2: Mapa de los plásmidos empleados**) y realizando una electroforesis. En ella se observarán dos bandas de diferente tamaño (la del inserto y la del vector) y se comprobará si coincide con el teórico.

Separación de inserto-vector: En este caso, una vez realizada la digestión enzimática y su respectiva comprobación mediante la electroforesis, se extrae el inserto a partir de un corte con el gel. Mediante el uso de un transiluminador para electrofóresis se observa en que parte del gel se encuentra el inserto deseado y, con una punta estéril se marcan los bordes que lo delimitan. Seguidamente, se corta con una *cuchilla pequeña punzante (estéril)* la parte del gel que contiene el inserto deseado y se

traspasa a un *Eppendorf*. En este procedimiento es necesario comprobar tantas veces como sea necesario en la Kodak EDAS que la parte del gel donde se encuentra el inserto deseado es totalmente extraída. Posteriormente se tratará este gel mediante la técnica de *Purificación* (Misma técnica comentada anteriormente pero con pasos previos de tratamiento de la muestra para eliminar el gel de la muestra).

Para llevar a cabo la digestión enzimática es necesario realizar la siguiente mezcla y dejar en el baño a 37°C durante 1 hora. Seguidamente, añadir 0,5 µL más de las enzimas de restricción y dejar en el baño a 37°C durante 1 hora más.

Finalmente, se comprueba si la muestra ha *cortado* correctamente y cumple los tamaños esperados mediante electroforesis de gel.

Tabla 14. Esquema de la mezcla necesaria para llevar a cabo la digestión enzimática.

Preparación Digestión Enzimática	
Plásmido	300ng
Enzima de restricción 1	0,5µL
Enzima de restricción 2	0,5 µL
Tampón	**Según concentración
Agua MiliQ hasta 15 µL	

Según el plásmido que se pretende cortar, es necesario añadir una o dos enzimas de restricción.

Hibridación

Para este proyecto se han prediseñado 4 pares de shARNs. Estos, como se ha mencionado en el apartado *Reactivos* vienen en forma monocatenaria y mediante esta técnica se provocará la hibridación de las cadenas para así tenerlas en forma bicatenaria y poder introducir las dentro del vector deseado.

Para llevar a cabo este procedimiento se preparará mezcla de la *Tabla 15* y se hervirá durante 5 minutos. Seguidamente se dejará reposar fuera del fuego hasta que recupere la temperatura ambiente y, finalmente, se guardarán las muestras para su posterior manipulación.

Tabla 15. Esquema de la mezcla necesaria para llevar a cabo la hibridación de los oligonucleótidos (shARNs).

Preparación Hibridación	
Oligonucleótido <i>forward</i>	2,5
Oligonucleótido <i>reverse</i>	2,5µL
Tampón M Roche	1 µL
Agua MiliQ hasta	15 µL

Secuenciación

Una vez realizadas las comprobaciones mediante la electroforesis y la digestión enzimática, la última comprobación a realizar para saber si el plásmido con el que se trabaja es el deseado consiste en secuenciarlo. En este proyecto, la secuenciación se ha realizado en *Servicios Científicotécnicos de la Universidad de Barcelona* y posteriormente analizado mediante herramientas bioinformáticas. Para llevar a cabo dicho proceso se ha preparado la muestra en el propio laboratorio, evaporándola para su posterior análisis.

La cantidad de muestra que se envía a analizar viene determinada por la longitud de la propia cadena, de manera que 1kb equivale a 100ng de ADN molde. Cada muestra se analiza tanto en sentido *forward* como *reverse* ya que la propia secuenciación no permite leer toda la cadena y es necesario realizar un montaje de ambos resultados para obtener la secuenciación completa. La cantidad de oligo añadida a la muestra es 100ng x 1kb de ADN molde.

Preparación del plásmido para secuenciar

1. En un *Eppendorf* de 0,2ml añadir la cantidad de muestra a analizar y el oligonucleótido pertinente.
2. En un Termostato en bloque dejar evaporar la muestra durante 15 minutos a 85 °C.

Cultivo celular

El mantenimiento de los cultivos celulares se realiza en condiciones estériles. Cualquier tratamiento celular se realiza en la campana celular (irradiada por UV 15 minutos antes de uso), desinfectada con etanol 70% previo a su uso y con material previamente esterilizado en autoclave. Los medios y soluciones utilizados se compran estériles o bien se esterilizan mediante filtros de 0,22 µm.

Descongelación celular

La línea celular con la que se trabaja se mantiene congelada en nitrógeno líquido. El procedimiento para tomar células es el siguiente:

1. Sacar las células del tanque de nitrógeno (siguiendo las precauciones propias de la manipulación de tal recipiente) y descongelarlas rápidamente a 37°C manteniéndolas entre las manos.
2. En la campana de flujo, traspasar el contenido del vial a un tubo Falcon de 15ml con 7ml de medio previamente preparado.
3. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. Durante estos 5 minutos, añadir 5ml de medio a la botella que se va a utilizar.
4. Eliminar el sobrenadante mediante absorción al vacío.
5. Resuspender las células con 5ml de medio (para botellas de 75cm²).
6. Traspasar la cantidad del Falcon a la botella con medio.
7. Agitar las células de manera que queden bien distribuidas alrededor de la botella.

Hasta la experimentación *in vitro* es necesario mantener las células durante una semana o dos para analizar el crecimiento de las células y así prever cuando habrá la cantidad de células necesarias para dicho experimento.

La confluencia de las células en cultivo puede causar cambios en las características bioquímicas y funcionales y por lo tanto es importante que el crecimiento de éstas no sea excesivo y siempre cierto espacio de crecimiento entre ellas.

Mantenimiento de células

Antes de empezar el proceso, es necesario dejar atemperar el medio y la tripsina (conservados en nevera) poniendo el primero en un baño a 37°C durante los 15 minutos previos a su uso y dejando la tripsina a temperatura ambiente.

1. Extraer el medio en el que se conservan las células mediante absorción al vacío. Es importante absorberlo inclinando la botella y evitando tocar la base de la botella

poniendo la punta de la Pipeta *Pasteur* en una de las esquinas y moviendo la botella para que todo el medio caiga en ese lugar.

2. Añadir (siguiendo las precauciones anteriores de no tocar la base) 5ml de PBS 1X y mover suavemente la botella para esparcirlo. Este reactivo desactivará el medio ya que éste inhibe la acción de la tripsina.
3. Añadir 1ml de tripsina y agitar suavemente para repartirla por toda la superficie.
4. Esperar a que las células se separen de la base de la botella. Para facilitar este proceso se pueden dar golpes secos a la pared de la botella. Comprobar que están desenganchadas mediante microscopio (se observa que las células son pequeñas esferas que se mueven por toda la botella al mover la tripsina).
5. Añadir 9ml de medio para inhibir la acción de la tripsina. Al añadirlo es importante que caiga por toda la base de la botella, para ello se recoge varias veces el mismo medio y se vuelve a añadir a la botella procurando que caiga por toda la base.
6. Se realiza la dilución deseada repartiendo las células anteriormente arrancadas en una o varias botellas con la cantidad de medio previamente añadido hasta llegar a 10 ml.
7. Guardar en la incubadora hasta su posterior tratamiento.

Congelación de células

Una vez realizados los experimentos se guardan las células en nitrógeno para su posterior uso en otro proyecto.

1. Trypsinizar células (Seguir los 5 primeros pasos de *Mantenimiento de células*).
2. Recoger las células en un Falcon de 15ml.
3. Centrifugar las células a 1500 rpm durante 3 minutos.
4. Extraer el sobrenadante absorbiéndolo al vacío y resuspenderlo en 1 ml de la solución de congelación de células.
5. Guardar las células en un *criotubo* y guardarlas en el recipiente de congelación para congelar células a -80°C.
6. Días después guardarlas en el tanque de nitrógeno.

Soluciones preparadas durante el mantenimiento de células

Tabla 16. Soluciones preparadas para el mantenimiento de las células.

Medio	PBS 1X
DMEM	NaCl 137 mM
Suero bovino fetal 10%	KCl 2.7 mM
Penicilina 100 U/ml y 100 µg/mL de	4,3mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
Estreptomicina	1,4KH ₂ PO ₄

Transfección

Mediante esta técnica se introducen los plásmidos en el interior de las células. La introducción del plásmido con el ADN recombinante en la que se ha situado el CDS permitirá más adelante la activación del mecanismo de silenciamiento génico (*Introducción*).

Las células HEK 293 son una línea celular transformada derivadas de preparaciones de riñón embrionario humano. Dado que son transformadas experimentalmente, las células HEK 293 no son un buen modelo para las células del riñón, no obstante, son fáciles de cultivar y transferir. El amplio uso de esta línea celular es debido a la extrema transfectabilidad por medio de varias técnicas. En este caso en concreto, se utilizarán las células HEK 293A, un tipo especial que tiene la capacidad de adherirse.

El medio utilizado con estas células fue *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

El método empleado en este proyecto es el del Fosfato Cálcico. Este método se basa en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. En este medio, precipitan formando unos agregados que son endocitados/fagocitados por las células.

Para llevar a cabo este procedimiento es necesario tener preparado con anterioridad tanto las células como los reactivos a utilizar:

Preparación células¹⁵

Con tal de disminuir al máximo aquellos factores que podían modificar la calidad de la transfección realizada (repercutiendo en los resultados) se ha llevado a cabo una prévia cuantificación de las células que se querían en cada pocillo. En todos ellos se ha llevado la transfección en placas de 6 pocillos y en cada uno de los pocillos se han añadido 2 ml de medio con células (300.000 células/pocillo).

Para la cuantificación es necesario trabajar con más de una botella de células y que su confluencia esté alrededor del 80%. Dicha cuantificación se ha llevado a cabo realizando los pasos siguientes:

1. *Tripsinizar* las células (Seguir protocolo *Mantenimiento Células* hasta el apartado 4).
2. Añadir 4ml de medio para inhibir la acción de la tripsina. Al añadirlo es importante que caiga por toda la base de la botella, para ello se recoge varias veces el mismo medio y se vuelve a añadir a la botella procurando que caiga por toda la base.
3. Recoger la muestra y añadirla en un *Falcon* de 50 ml.
4. En un *Eppendorf* añadir 5 µL de la muestra y 5 µL de Trypan Blue (comercial). Mezclar bien la muestra con la pipeta y añadir los 10 µL en un portaobjetos.
5. Insertar la placa en el Contador de células y contabilizar las células.
6. Calcular la cantidad de muestra necesaria para cubrir las células necesarias para el experimento.
7. En un *Falcon* de 50 ml, añadir dicha cantidad y rellenar hasta completar la cantidad de mezcla necesaria. (X ejemplo: 3 placas x 6 pocillos x 2ml/pocillo = 36 ml).
8. Pipetear 2ml por cada pocillo, pipeteando “arriba y abajo” previamente para recoger las células que han precipitado en el mismo *Falcon*.
9. Mover suavemente la placa para esparcir las células por todo el pocillo y guardarlo en la incubadora.

Al día siguiente, una hora antes de realizar la transfección, cambiar el medio de las células.

Preparación reactivos

La eficacia del método de fosfato de calcio se ve influenciada por el pH de las células y la temperatura del reactivo, de manera que si la muestra de BBS 2X se encuentra en un pH

¹⁵ Todo este procedimiento se realiza en campana de flujo laminar, tomando las debidas precauciones para no contaminar las muestras.

erróneo no formará precipitados o formará pocos y, si éste no se guarda en la nevera (para usos próximos) o en el congelador (para usar a largo plazo) , pueden aparecer precipitados, perdiendo su fiabilidad.

Para controlar el pH se realiza antes la “prueba de la gota”:

1. Preparar el BBS2X realizando la mezcla de la *Tabla 17*.
2. En 5 *Eppendorffs* añadir 50 μL pH entre el 6.8 y el 7.2 (graduarlos en el pHímetro con NaOH i HCl).
3. Preparar la mezcla de la *Tabla 17* escogiendo como plásmido uno cualquiera (no hace falta que sea el mismo que se va a transfectar).
4. En el vórtex, añadir “gota a gota” los 50 μL de BBS2X.
5. En un portaobjetos, añadir 1 gota (1 μL de muestra) de cada una de las muestras y mirar en el microscopio si ha aparecido precipitado.
6. Guardar en la nevera o congelador.

Finalmente, una vez realizados los pasos anteriores se procede a transfectar:

1. Preparar la mezcla a transfectar.
2. Mezclar en vórtex.
3. Añadir 20 μL ó 30 μL (según si es duplicado o triplicado) a cada una de las muestras de CaCl_2 2,5M.
4. Mezclar en vórtex.
5. En el vórtex, añadir 200 μL ó 300 μL de BBS2X “gota a gota”.
6. Comprobar en el microscopio que se forma precipitado.
7. Añadir (en la campana) la mezcla preparada a cada pocillo.
8. Dejar incubar durante 48h.

Reactivos

Tabla 17. Reactivos empleados para la preparación de los plásmidos para transfección.

BBS2X	Concentración	Volumen
BES	100mM	25ml
NaCl	5M	2,8ml
Na ₂ HPO ₄	0,5M	150 µl
H ₂ O	Hasta	50ml
Reactivos finales		
CaCl ₂	2,5M	10 µl x replicado
BBS2X	2X	100 µl x replicado

Extracción de ARN

Una vez transcurrido el tiempo de transfección se extrae el ARN resultante de cada una de las placas. Para ello, primero se extrae el medio de cada una de las muestras y, con cuidado, se realiza un lavado (Utilizando PBS1X estéril) de las células, con cuidado siempre de que la fuerza del propio líquido no arranque las células depositadas en la base de los pocillos.

Una vez realizado el lavado correspondiente, mediante el *ARN Isolation KIT* se extrae el ARN a partir de ciertos lavados, similares a los del proceso de *Miniprep/Midiprep*, cuya base reside en la ruptura de las paredes celulares mediante Solución de Lysis (Incluida en el KIT) Y posteriores lavados con preparados especiales.

La muestra resultante que no se someterá a *Retrotranscripción* se guardará a -80°C debido a la sensibilidad del ARN a la degradación.

Retrotranscripción

Para cuantificar los niveles de expresión se realizó previamente la transcripción inversa del mRNA a ADN complementario (cADN) ya que el método de *PCR screening* solo cuantifica ADN. La transcripción inversa es catalizada mediante la enzima retrotranscriptasa (RT). Para ello se elaboró la mezcla de la

Tabla 18 y se dejó durante 60 min a 37 °C. Para prevenir la degradación del ARN se incluyó inhibidor de ARNs. Esta mezcla se alicuotó y se guardó a -80 °C.

Tabla 18. Preparación de mezcla para Retrotranscripción.

Reactivo	Concentración	Volumen
Tampón Retrotranscripción	5X	4 µl
dNTPs	10 mM	1 µl
Hexámeros aleatorios	62,5 ng/µl	2 µl
ARNSin	80 U/µl	0,5 µl
ARN total		1,5 µg
MMLV-RT	200 U/µl	1 µl
H ₂ O		hasta 20 µl

qPCR

Este último paso del proyecto estudia en tiempo real la amplificación de una cadena de ADN, es decir, monitoriza la aparición de ADN en cada uno de los ciclos de una PCR. Para llevar a cabo este proceso, se le añade a la mezcla de la PCR un reactivo que permita al ADN la liberación de fluorescencia, la cual es detectada por el propio sistema y genera un gráfico en el que en el eje X se sitúan los ciclos y en el eje Y la fluorescencia detectada por el termociclador.

Tabla 19. Preparación muestra para estudio por qPCR.

Reactivo	Volumen
Muestra de cADN	3,2 µl
Oligonucleotido forward	1,6 µl
Oligonucleotido reverse	1,6 µl
Power SYBR Green	20 µl
Agua libre de ADNsas	13,6 µl
Volumen total	40 µl

Previo a la realización de qPCR comparativas para el análisis de genes de interés se evaluó la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos mediante curvas estándar realizadas a partir diluciones seriadas (1/5, 1/10, 1/20, 1/40) de una muestra de cADN. Para validar el proceso de amplificación, el producto de PCR de cada dilución se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % valorando la presencia de una única banda del tamaño esperado.

Para la determinación de la cantidad de mRNA de un gen en la muestra, primero se normalizaron los valores obtenidos usando *dos housekeeping* (dos genes que teóricamente no cambian bajo las condiciones de estudio). (Pfaffl, 2001). En este caso se utilizó el CMVB (normalizar según la calidad de la transfección) y el HPRT (normalizar para el mismo número de células transfectadas).

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{Gen endógeno})$$

En este método se toma una muestra como referencia para efectuar la comparación con las demás muestras, obteniendo así el valor $\Delta\Delta Ct$.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra X}) - \Delta Ct (\text{muestra de referencia})$$

Debido a que el proceso de amplificación presenta un comportamiento exponencial, los valores son transformados a una escala lineal que permita realizar una comparación entre distintos valores mediante una función logarítmica que resulta en la ecuación:

$$\text{Valor de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Tratamiento estadístico

Los valores resultantes de la qPCR se analizan mediante el método estadístico *Scheffé* de comparaciones múltiples. Este método estadístico se aplica en aquellos estudios en los que se analiza el comportamiento de los tratamientos de un factor (en este caso, Inhibición de la G6Pasa) mediante un análisis de varianza, cuyo objetivo es saber si dichos tratamientos difieren significativamente entre sí y, de esta manera, determinar una vez aceptada la diferencia de respuesta de estos tratamientos, cuál de ellos producen mayor efecto.

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Obtención de los constructos plasmídicos pCpG·shARN1, pCpG·shARN2, pCpG·shARN3 y pCpG·shARN4

Se recibieron 4 pares de cadenas de ADNs monocatenarias complementarias entre sí de un tamaño aproximado de 60-70 nucleótidos. Éstas fueron sometidas a un proceso de hibridación por el cual se unieron mediante puentes de hidrogeno entre ellas, obteniendo así las 4 cadenas bicatenarias que se convertirían posteriormente en los shARNs. La mezcla preparada para llevar a cabo la hibridación, así como las concentraciones medidas en *Nanodrop* empleando agua MiliQ como blanco son:

Tabla 20. Preparación de la mezcla para la Ligación y concentraciones obtenidas tras ella.

Hibridación ADN		Concentraciones	
Muestra 1	2,5 µL	shARN1	502,3 ng/µL
Muestra 2	2,5 µL	shARN2	508,1 ng/µL
Buffer M Roche	1,0 µL	shARN3	510,2 ng/µL
Agua MiliQ	4,0 µL	shARN4	507,8 ng/µL
Total	10 µL		

Una vez hibridados, el objetivo siguiente fue unirlos con el vector pCpG preparado por el grupo de investigación. Para llevar a cabo la ligación se preparó la mezcla de la *Tabla 21*, teniendo en cuenta para el cálculo de cantidades vector -inserto 1:3 las siguientes características:

Tabla 21. Características del vector y cada uno de los insertos a ligar. Mezcla para la ligación de ambos.

	Concentraciones	Tamaño	Mezcla ligación	
shARN1	502,3 ng/µL	66 pb	Plásmido + inserto en proporción 1:3	4 µL
shARN2	508,1 ng/µL	66 pb	T4 ADN ligasa	1 µL
shARN3	510,2 ng/µL	66 pb	2X Rapid Ligation Buffer	5 µL
shARN4	507,8 ng/µL	66 pb	Total	10 µL
pCpG	21,2 ng/µL	2777 pb		

Una vez ligadas se sometieron a las muestras a un proceso de transformación para poder tenerlas en células y así obtener mayor cantidad de éstas, además de comprobar su correcta

ligación y tamaño. La transformación se hizo en células *E.Coli cepa GT115* y ya que el vector pCpG presenta resistencia a la *Zeocina*, las placas se prepararon con una proporción de 50µg Zeocina por cada 100 ml de medio LB. El crecimiento en las placas fue distinto para cada uno de los shARNs, atribuyéndose este hecho a posible error humano en el momento de la siembra de las placas.

Las colonias que crecieron se analizaron mediante *PCR Screening* siguiendo las cantidades y ciclos adjuntos en la *Tabla 22*. El resultado fue analizado mediante electroforesis de gel, obteniendo el siguiente resultado:

Tabla 22. Cantidades para la amplificación de los shARNs de 15µL y número de ciclos y temperaturas para dicho proceso donde: **Des:** Temperatura de desnaturalización; **Al:** Temperatura de alineamiento; **Ex:** Temperatura de extensión. Primera y última temperatura son de acondicionamiento.

Mezcla de PCR para un replicado (15µL)		Programa empleado para la amplificación de la G6Pasa (x 35 ciclos)	
Tampón 10 X	2µL	94°C	2'
dNTPs	0,3 µL	Des:	30"
		94°C	
JDOL416	0,3 µL	Al: 55°C	30"
Muestra <i>reverse</i> de ADN	0,3 µL	Ex: 72°C	2'20"
TaqPol	0,09 µL	15°C	5'
cADN	3 µL		
Agua MiliQ	11,7µL		
Total	15 µL		

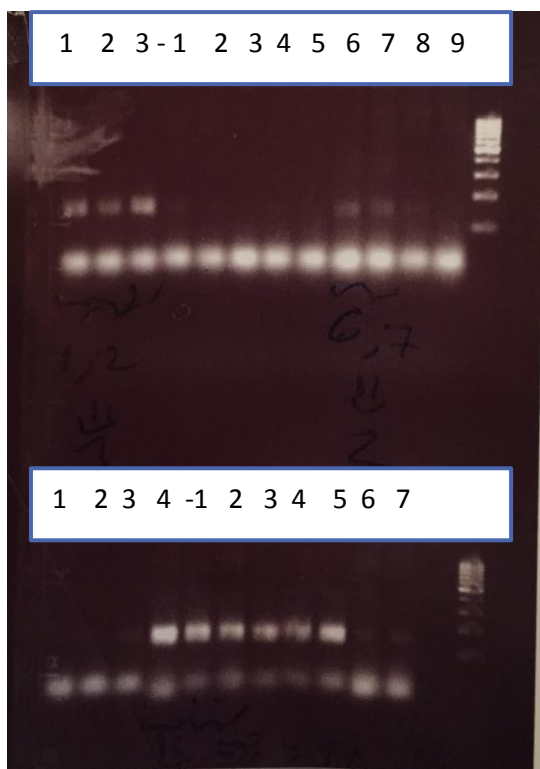


Figura 14. Resultado electroforesis tras la ligación de pCpG e insertos shRNAs.

Tamaño esperado 150-200 pb.

De esquina superior izquierda a derecha:

1, 2 y 3 - Placa 1

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 - Placa 2

De esquina inferior izquierda a derecha:

1, 2, 3 - Placa 4

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 - Placa 3

Esperando un tamaño de 150-200pb, se obtuvieron posibles positivos en cada una de las placas. Finalmente se seleccionaron las siguientes muestras para crecerlas en un cultivo de LB con Zeocina :

Placa 1 (pCpG-shARN₁) : Muestras <1> y <2>.

Placa 2 (pCpg-shARN₂): Muestras <6> y <7>.

Placa 3: (pCpG-shARN₃): Muestras <1> y <2>.

Placa 4(pCpG-shARN₄): Muestra <3>.

El criterio escogido para la selección de las muestras se basó en el aislamiento de la colonia de las restantes y el grado de marcado de la electroforesis.

Las colonias seleccionadas se cultivaron en medio LB con *Zeocina* siguiendo la proporción especificada anteriormente y se sometieron a un proceso de *Midiprep* del cual, tras el tratamiento, se obtuvieron las siguientes concentraciones:

Tabla 23. Concentraciones obtenidas de pCpG-shARNx tras la *Midiprep*.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Muestra	Concentración (ng/μL)
pCpG-shARN ₁		pCpG-shARN ₃	
1	1	1	106,2
2	2	2	151,5
pCpG-shARN ₂		pCpG-shARN ₄	
6	3	4	137,4
7	136,8		

Mediante la Digestión Enzimática se realizó la última comprobación de las muestras. Para ello, a partir del mapa de restricción se estudió que enzimas de restricción permitían llevar a cabo este proceso, siendo éstas la Acc651 y HindIII. La mezcla de la **Tabla 24** se mantuvo a 37°C durante 1h y se observó mediante electroforesis de gel, obteniendo la siguiente fotografía:

Tabla 24. Preparación Digestión enzimática pCpG-shARNx según enzimas de restricción pCpG (ACC651 y Hind III).

Digestión enzimática	
Muestra	3 μL
ACC551	0,3 μL
Hind III	0,3 μL
Tampón 10X	2 μL
Agua MiliQ	4,4 μL

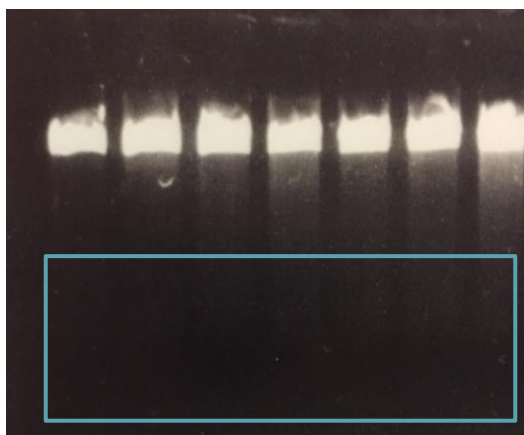


Figura 15. Electroforesis de Digestión Enzimática pCpG-shARNx usando como enzimas de restricción ACC651 y HindIII.

La diferencia del tamaño entre el inserto y el vector es tan notable que, en el momento de realizarse la electroforesis de gel, al ser los insertos tan pequeños, en un gel de agarosa TAE 1X, los insertos se desplazaban demasiado llegando a ser prácticamente invisibles. Sin embargo, como se puede observar en el recuadro marcado, el gel presenta una línea horizontal común en todos ellos. Esta línea muestra que el vector ha sido cortado y, en vez de ser un vector circular, son dos cadenas de ADN lineales.

Finalmente, como todos presentaban el conjunto vector-inserto esperado, se enviaron a secuenciar (Parque científico de la Universitat de Barcelona) aquellas muestras de mayor concentración para cada uno de los shARNs (pCpG-shARN₁ muestra 2, pCpG-shARN₂ muestra 6, pCpG-shARN₃ muestra 2 y pCpG-shARN₄ muestra 3). El estudio de las secuencias se encuentra en *el ANEXO 4: Secuenciación*. En la mezcla para secuenciar se empleó el oligo JDOL1416R, el cual había sido utilizado como oligonucleótido forward en la *PCR screening*.

Al comparar la secuencia obtenidas se observó que todas ellas presentaban el inserto completo en el vector pCpG, concluyendo así la correcta construcción de los plásmidos pCpG-shARN₁, pCpG-shARN₂, pCpG-shARN₃ y pCpG-shARN₄.

3.2 Obtención del plásmido pcADN3-G6P

Para obtener el plásmido capaz de sobreexpresar la G6Pasa el primer paso que se realizó fue clonar la cadena codificante (cADN) de la G6Pasa diseñada por el propio grupo de investigación. La mezcla preparada para dicha amplificación es la adjunta en la Tabla 25. Esta mezcla se preparó por triplicado para asegurar el resultado obtenido.

Tabla 25. Cantidades para la amplificación de la G6Pasa en *Eppendorffs* de 150 μL y número de ciclos y temperaturas para dicho proceso donde: **Des:** Temperatura de desnaturalización; **Al:** Temperatura de alineamiento; **Ex:** Temperatura de extensión. Primera y última temperatura son de acondicionamiento. En este caso, debido a que se prepara una mezcla para futura purificación, las cantidades de TaqPol se han modificado añadiendo 0,05 μL por cada 25 μL de mezcla extras para aumentar la eficacia de dicha enzima.

Mezcla de PCR para un replicado (150 μL)		Programa empleado para la amplificación de la G6Pasa (x 35 ciclos)	
Tampón 10 X	15 μL	94°C	2'
dNTPs	3 μL	Des: 94°C	30"
MS1614F	3 μL	Al: 55°C	30"
MS1615R	3 μL	Ex: 72°C	2'20"
TaqPol	1,2 μL	15°C	5'
cADN	3 μL		
Agua MiliQ	11,7 μL		
Total	121,8 μL		

Una vez amplificado se comprobó mediante electroforesis el tamaño de la muestra, obteniendo como resultado:

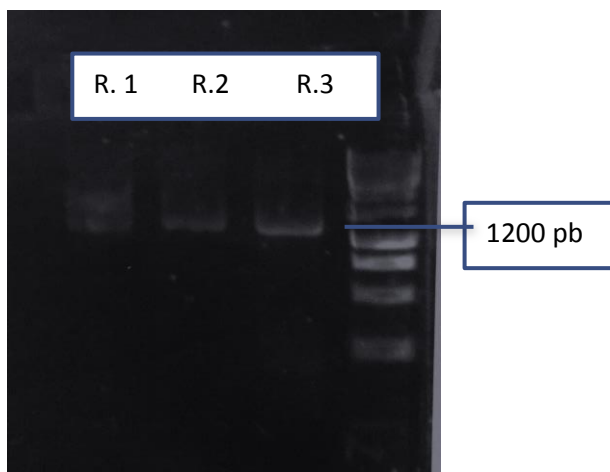


Figura 16. Amplificació G6Pasa per PCR a partir de MS1614F y MS1615R.

La mostra restant de la PCR se sotmetí a un procés de purificació obtenint les següents concentracions:

Tabla 26. Concentracions de G6Pasa tras amplificació.

Concentracions	
Replicado 1	51,2 ng/μL
Replicado 2	52,1 ng/μL
Replicado 3	62,7 ng/μL

Una vegada la mostra fou lligada, se procedí a la transformació per augmentar la quantitat de producte obtingut. En aquest cas, el vector pGem - T - Easy presenta resistència a la *Ampicilina* (ANEXO 2: Mapa de los plásmidos empleados), de manera que a les plaques de LB agar se li afegí 100 μg/ml de *Ampicilina* i se transformaren en cèl·lules *E coli DH5α*, deixant les tres plaques, finalment, incubant-se durant tota la nit a 37 ° C.

Se observà a la matí següent que en les tres plaques creixeren colònies (en la Placa 2 en menor mesura), així que per verificar que aquestes contenien en el seu interior la cadena pGem - T - Easy se prengueren un determinat nombre de mostres de cada placa (segons la confluència de les colònies) i se amplificaren mitjançant *PCR screening* seguint les especificacions de la *Tabla 27*.

Tabla 27. Cantidades para la amplificación del conjunto pGem - T - Easy · G6Pasa en Ependorffs de 15µL, y número de ciclos y temperaturas para dicho proceso donde: Des: Temperatura de desnaturalización; Al: Temperatura de alineamiento; Ex: Temperatura de extensión. Primera y última temperatura son de acondicionamiento.

Mezcla de PCR para un replicado (15µL)		Programa empleado para la amplificación de la G6Pasa (x 35 ciclos)	
Tampón 10 X	2µL	94°C	2'
dNTPs	0,3 µL	Des: 94°C	30"
T7	0,3 µL	Al: 55°C	30"
pGem - T - Easy rev	0,3 µL	Ex: 72°C	2'20"
TaqPol	0,09 µL	15°C	5'
Colonia picada	---		
Agua MiliQ	13,7µL		
Total	15 µL		

El resultado se analizó por electroforesis de gel y se obtuvieron las siguientes fotografías:

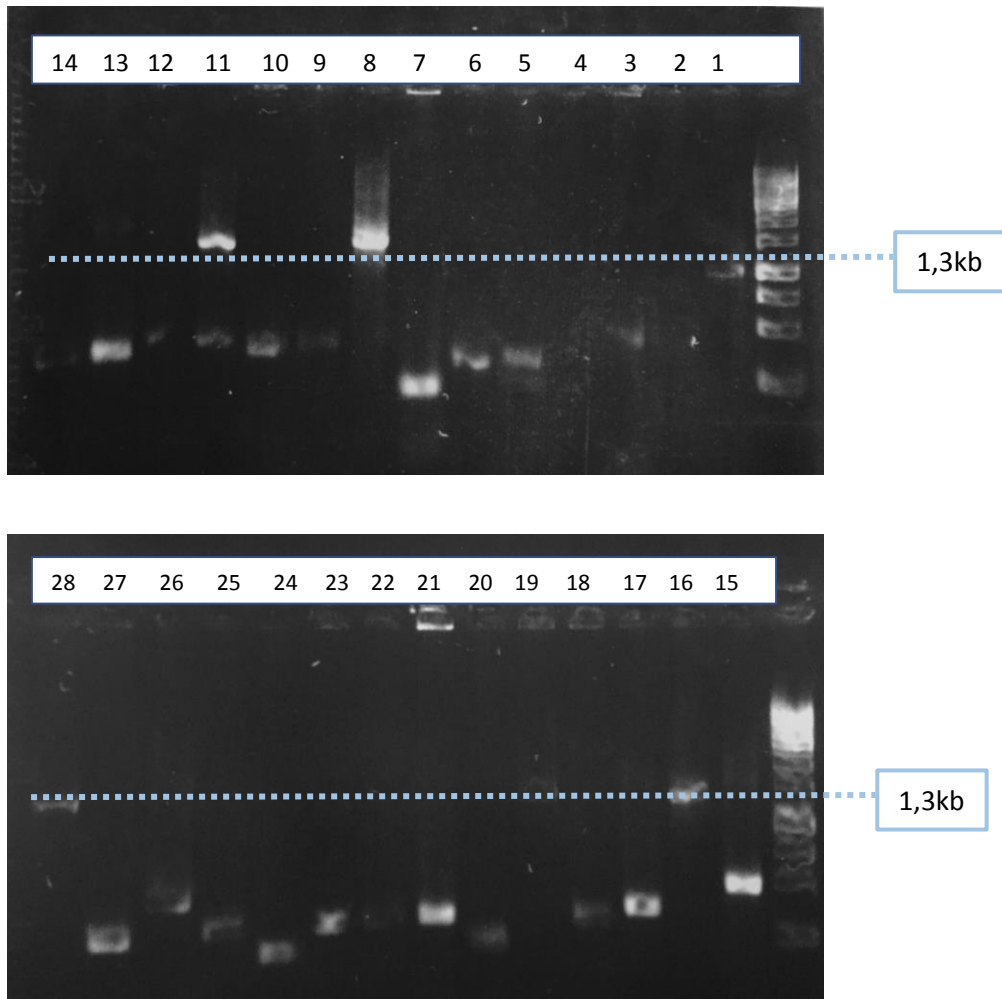


Figura 17. Electroforesis de gel tras ligación de inserto PGem-T-Easy y G6Pasa. Placa 1. Tamaño esperado: 1300 pb Aprox.

Placa 1: Fue la placa que presentó mejores resultados. Como se puede observar, se distinguen muestras claramente negativas y seis posibles positivos. Estos posibles positivos tienen notablemente marcada la franja en el punto esperado. Se seleccionaron las muestras: <1> , <8> , <11> , <16> , <19> , <28>.

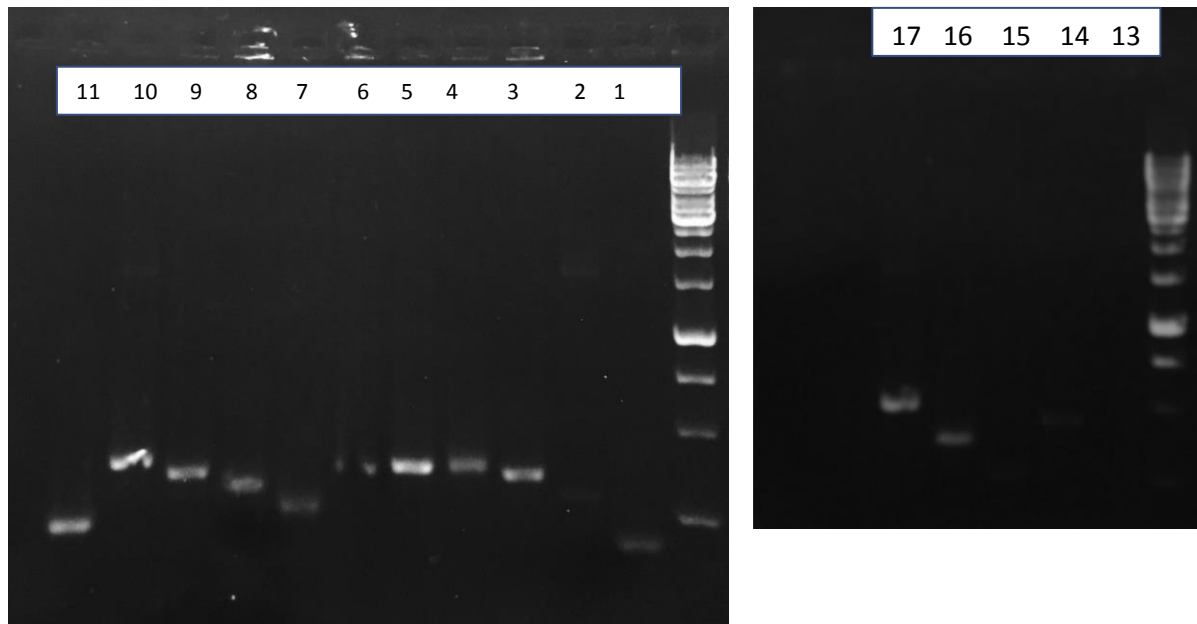


Figura 18. Electroforesis de gel tras ligación de inserto PGem-T-Easy y G6Pasa. Placa 1.
Tamaño esperado: 1300 pb Aprox.

Placa 2: Como se puede observar, el resultado obtenido presenta unas marcas muy débiles en la zona donde debería estar la muestra y, por lo tanto, a pesar de que se tomaron muestras de ésta también, se marcaron como posibles negativas. Se seleccionaron las muestras: <2> y <10>.

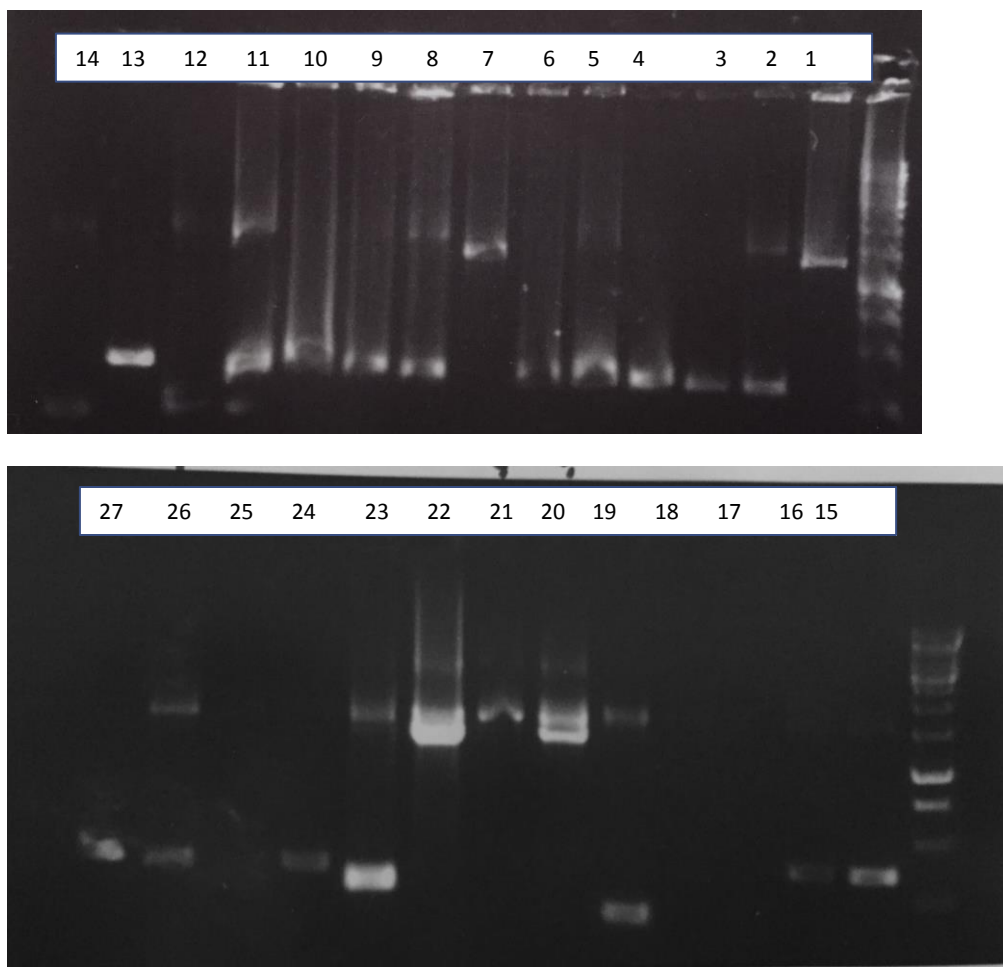


Figura 19. Electroforesis de gel tras ligación de inserto PGem-T-Easy y G6Pasa. Placa 1.
 Tamaño esperado: 1300 pb Aprox.

Placa 3: En este caso se visualizan, como en la placa 1, varios posibles positivos y negativos, con el inconveniente que algunos de los posibles positivos presentan dos franjas, lo que hace sospechar de una posible contaminación de la muestra. Se seleccionaron las muestras: <1>, <2>, <7>, <20>, <21>, <22> y <26>.

Las muestras seleccionadas fueron cultivadas durante toda la noche en Tubos de Ensayo de 10ml con 1000 µg/ml de *Ampicilina* según las condiciones especificadas en el apartado de *Cultivo* y seguidamente se guardó parte del producto resultante (300µL) en glicerina, se mezcló y se guardó a -80° C. El producto restante se sometió a un proceso de *Miniprep* para extraer el ADN deseado. Las concentraciones obtenidas de cada una de las muestras estudiadas son:

Tabla 28. Concentraciones de las muestras que presentan la posibilidad de ser el plásmido construido pGem - T - Easy · G6Pasa.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Muestra	Concentración (ng/μL)
<i>Placa 1</i>		<i>Placa 3</i>	
1	46,6	1	82,5
8	104,8	2	49,0
11	92,7	7	74,7
16	109,7	20	50,0
19	72,1	21	22,5
28	114,4	22	62,4
<i>Placa 2</i>		26	55,7
2	146,0		
10	94,0		

A estas muestras se les aplicó una Digestión Enzimática. Mediante el estudio del mapa de restricción del conjunto vector e inserto se observó que éste presenta dos puntos de corte con EcoRI, así que se mantuvo la mezcla durante 45 minutos en un baño de agua a 37° C.

Tabla 29. Resumen de mezcla para la Digestión Enzimática del conjunto vector - inserto pGem - T -Easy y G6Pasa.

Digestión enzimática	
Muestra	3 μL
EcoRI	0,3 μL
Tampón esp. EcoR I	1,5 μL
Agua MiliQ	10,2 μL

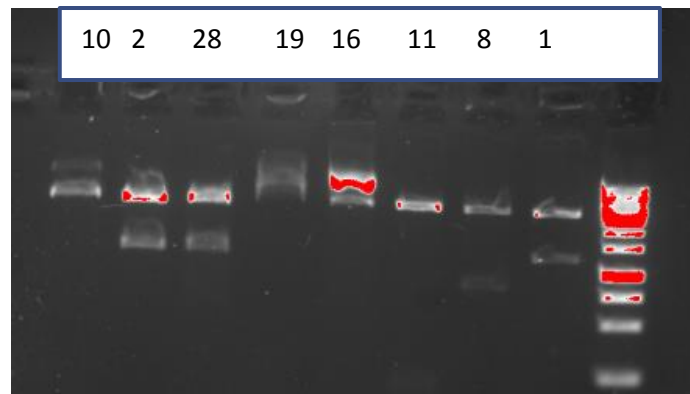


Figura 20. Digestión enzimática por EcoR1 de la placa 1 y 2. Tamaño esperado de <1200> y <5400> pb. Placa 1: <1>, <8>, <11>, <16>, <19> y <28>. Placa 2: <2> y <10>. El color rojo de esta foto es debido al contraste de la fotografía en el momento de hacer la captura.

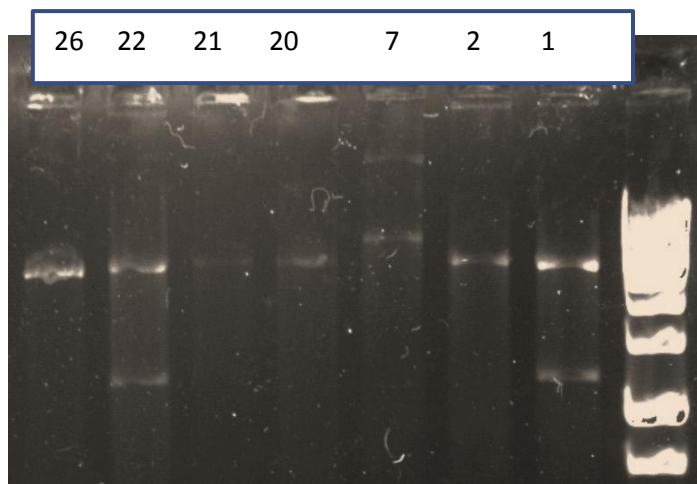


Figura 21. Digestión enzimática por EcoR1 de la placa 3. Tamaño esperado de <1200> y <5400> pb.

Observándose que las muestras de mayor concentración coincidían con aquellas que presentaban las dos franjas de corte del tamaño esperado (<1200> y <5400> pb) con mayor claridad, se decidió llevar a secuenciar las muestras Placa 1. Muestra <28>, Placa2. Muestra <2> y Placa3. Muestra <22> al servicio científico de la UB. Estas muestras se prepararon añadiendo los oligos propios del vector (T7 y pGeM - T - Easy).

Tras analizar las secuencias se observó que la muestra 28 (Placa 1) presentaba coincidencias totales con la secuencia de la G6Pasa, confirmándose así finalmente que se ha obtenido el plásmido **pGem - T - Easy · G6Pasa**.

El vector pGem - T - Easy sirve como intermediario en la ligación entre un inserto y un vector de funcionalidad específica, en este caso el pcADN₃. Para llevar a cabo este proceso se consideró necesario aumentar la cantidad de muestra con la que trabajar, ya que así en caso de errores o imprevistos, debía quedar muestra restante para poderlo repetir tantas veces como fuera necesario. Para ello, se cultivó en un Erlenmeyer 150 ml de LB junto con 100ug/ul de *Ampicilina* y se dejó crecer durante toda la noche en agitación. Tras esto, se realizó una *Midiprep* obteniéndose una concentración de 202,6 ng/μL.

Seguidamente se extrajo el tramo de G6Pasa del plásmido **pGem - T - Easy · G6Pasa**. Para ello, se sometió a una Digestión Enzimática tanto el plásmido en su totalidad como el vector pcADN₃. En este caso, al precisarse un corte muy determinado se realizaron diferentes repeticiones sobre la misma muestra, añadiendo al pasar 1 hora 1 μL de las enzimas en cada una de las mezclas.

Tabla 30. Digestión enzimática paralela de pcADN₃ y conjunto pGem-T-Easy·G6Pasa para comprobación de tamaño y posterior corte de gel de pGem-T-Easy·G6Pasa.

Digestión enzimática			
pCADN ₃		pGem - T - Easy · G6Pasa	
pCADN ₃	5 μL	Plásmido	5 μg - 24,5 μL
EcoRI	2 μL	EcoRI	2 μL
Hind III	2 μL	Hind III	2 μL
Tampón Tango 2X	10 μL	Tampón Tango 2X	10 μL
Agua MiliQ	31 μL	Agua MiliQ	11,5 μL

Mientras la purificación del pcADN₃ se realizó de la misma manera que para la purificación de la amplificación de la G6Pasa, en el caso del plásmido fue necesario primero extraer el inserto de la G6P antes de purificar. Ya que el corte se hace con el objetivo de separar vector de inserto, cortando aquel trozo de gel donde, por tamaño, se supo que estaba el inserto en cuestión y se sometió a un proceso para extraerlo del gel.

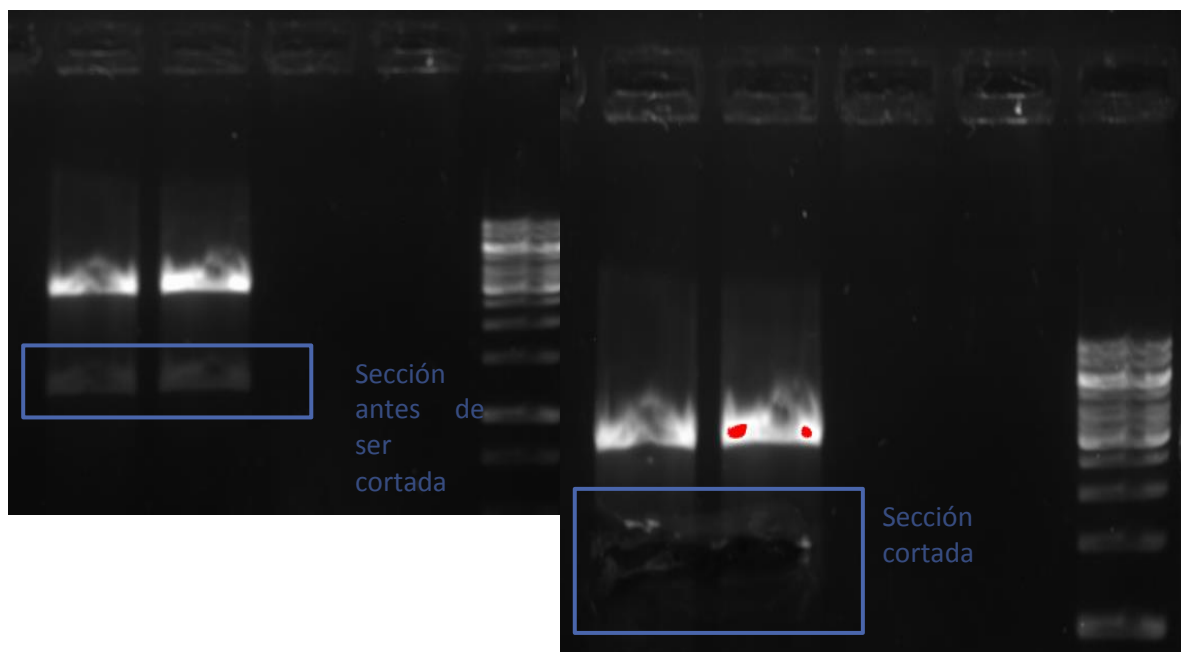
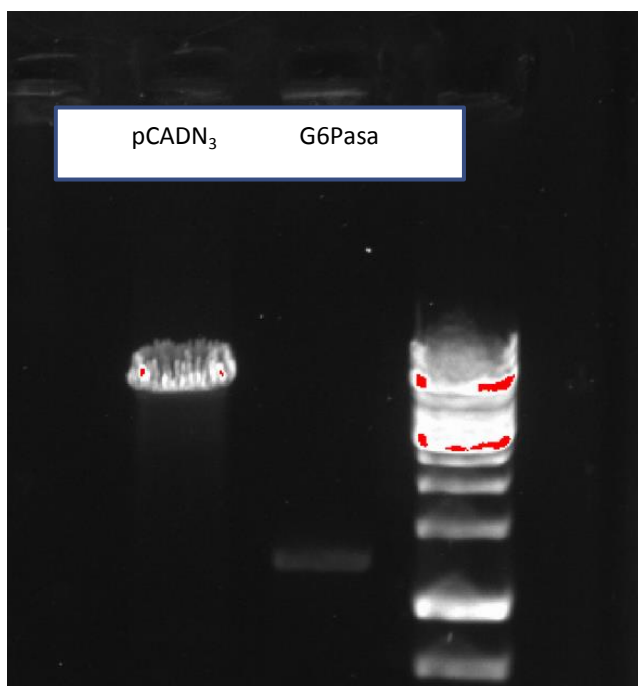


Figura 22. Pre y Post corte de la sección de gel que contenía la G6Pasa.

Tras la purificación se obtuvo una concentración de 80,1 ng/μL de pCADN₃ y 10,4 ng/μL de G6Pasa. Esta diferencia de concentración es debido, entre otros motivos, a la pérdida de muestra que se hace al cortar el gel y manipularlo. Ésta no supuso ningún inconveniente a la hora de desarrollar el proyecto.



Repitiendo el procedimiento anterior, se ligaron ambos plásmidos. El cálculo de las cantidades se ha basado en los siguientes datos:

Glucosa

[] 10,4 ng/μL

Tamaño: 1,25 kb

Cantidad añadida: 3,38 μL

pCADN₃

[] 80,1 ng/μL

Tamaño: 5,4 kb

Cantidad añadida: 0,62 μL

Figura 23. Comprobación final del tamaño de pCADN₃ y G6P. Tamaño pCADN₃: 5,4kb ; Tamaño G6Pasa: 1,25kb

El resultante de esta ligación fue sometido a una transformación para crecerlo y obtener mayor cantidad de muestra. En este caso se añadieron 5 µL de Ligación y 200 µL de células. Siguiendo con el protocolo anterior, se sometió a la comprobación de las colonias obtenidas mediante una *PCR screening*. Se tomaron 24 muestras de la placa cultivada.

Tabla 31. Cantidades para la amplificación del conjunto pcADN₃ · G6Pasa en Ependorffs de 15µL, y número de ciclos y temperaturas para dicho proceso donde: **Des:** Temperatura de desnaturalización; **Al:** Temperatura de alineamiento; **Ex:** Temperatura de extensión. Primera y última temperatura son de acondicionamiento.

Mezcla de PCR para un replicado (15µL)		Programa empleado para la amplificación de la G6Pasa (x 35 ciclos)	
Tampón 10 X	2µL	94°C	2'
dNTPs	0,3 µL	Des: 94°C	30"
T7	0,3 µL	Al: 55°C	30"
pcADN ₃ rev	0,3 µL	Ex: 72°C	2'
TaqPol	0,09 µL	15°C	5'
Colónia picada	---		
Agua MiliQ	13,7µL		
Total	15 µL		

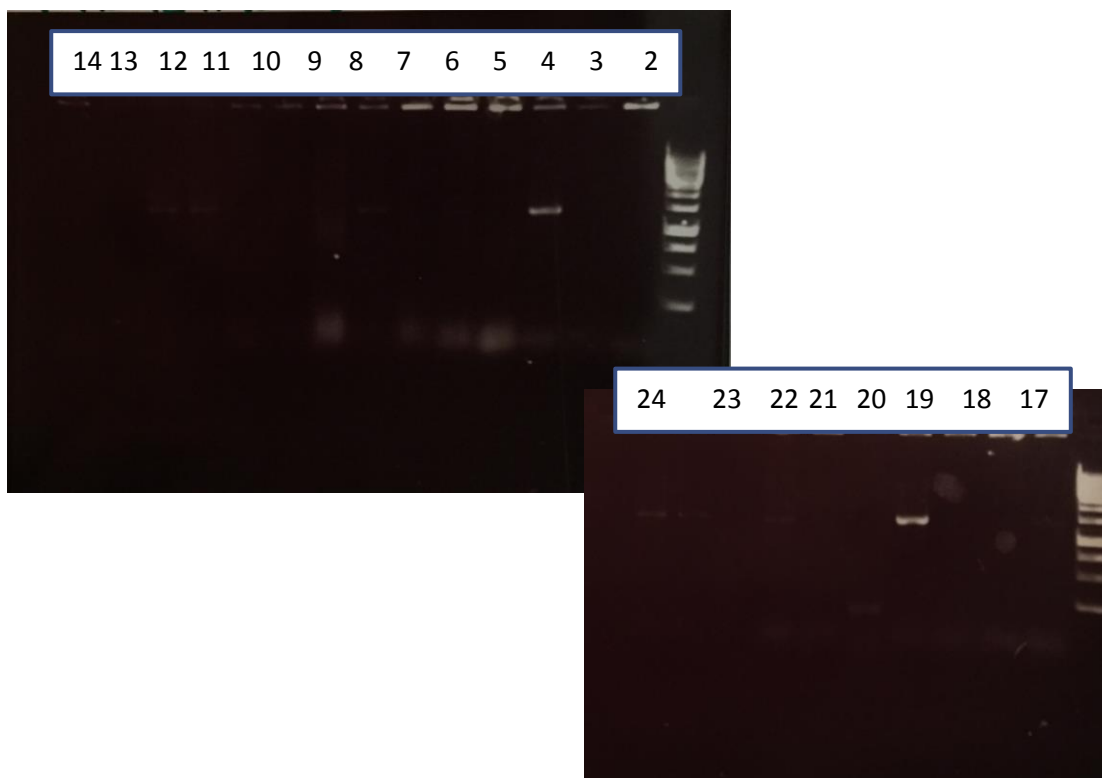


Figura 24. Electroforesis de *PCR screening* de la ligación pCADN3·G6Pasa. Tamaño esperado 1,3kb Aprox. Muestras seleccionadas: <3>, <5>, <7>, <11>, <12>, <18>, <21>, <23> y <24>.

Estas muestras se cultivaron en LB con *Ampicilina* tras una noche en agitación y a 37 ° C y se sometieron a una *Miniprep*, obteniéndose las concentraciones de la **Tabla 32**.

Tabla 32. Concentraciones obtenidas tras la *Miniprep* realizada los cultivos de posible conjunto PcADN₃·G6Pasa.

Muestra	Concentración (ng/μL)
3	138,3
5	118,0
7	104,3
11	119,1
12	36,9
18	178,1
21	92,3
23	286,6
24	209,7

Seguidamente se realizó la digestión enzimática como método de comprobación durante 1 hora a 37 ° C. El resultado es el que se observa en la **Figura 25**.

Tabla 33. Mezcla para la digestión enzimática de los posibles conjuntos PcADN₃-G6Pasa.

pGem - T - Easy · G6Pasa	
Muestra	3 µL
EcoRI	0,3 µL
Hind III	0,3 µL
Tampón 10 X	2 µL
Agua MiliQ	4,4 µL
Total	15 µL

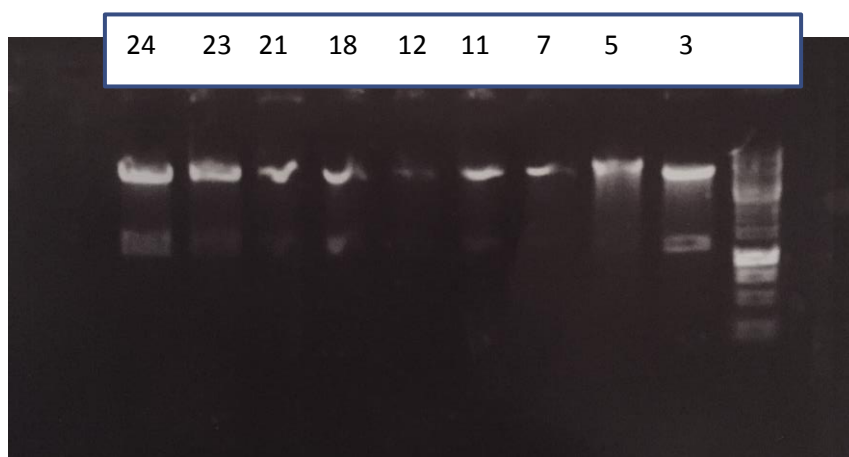


Figura 25. Digestión enzimática de pcADN₃-G6Pasa para la comprobación de su composición. Tamaños esperados: G6Pasa 1200 pb; pCADN₃ 5,2 kb.

En este caso no se secuenciaron diversas muestras sino que, al ver la número 24 con un corte tan marcado, y teniendo una concentración elevada, aparte de que la colonia en la placa estaba aislada, se decidió apostar por ella directamente. La secuencia enviada se encuentra adjunta en el ANEXO 4: **Secuenciación**.

Al coincidir la secuencia enviada con la codificante de la G6Pasa, se confirmó que la ligación se realizó correctamente y el inserto está en el interior del vector, en la posición deseada, obteniendo así el plásmido **pcADN₃ · G6Pasa**.

3.3 Validación del efecto silenciador de los plásmidos pCpG-shARN1-4 sobre la expresión génica de la G6Pasa de dorada mediante transfección transitoria de células eucariotas

Finalmente, una vez diseñados los constructos plasmídicos capaces de sobreexpresar o inhibir la G6Pasa, se comprobó su funcionalidad mediante el estudio *in vitro*.

El primer paso fue el mantenimiento y la puesta a punto de las células 293A durante dos semanas, garantizando su correcto crecimiento y asegurando que éstas no habían padecido ningún tipo de contaminación que pudiese perjudicar al ensayo. Para ello, se observó diariamente el estado de éstas y, aproximadamente cada dos días, se realizaron *pases* para diluirlas y evitar que estas llegaran a un estado confluyente y por lo tanto, a su muerte gradual.

El viernes anterior al ensayo se prepararon 4 botellas con 10ml de células 293A en medio DMEM (junto con los aditivos especificados en *Tabla 16*). Tras el fin de semana se realizó el conteo de las células que se tenían y se prepararon las placas de 6 pocillos. En cada uno de los ensayos realizados se trabajó con 300.000 células. Tras incubar las placas durante la noche se realizó cambio de medio y tras una hora se realizó la transfección. La cantidad de plásmido que se añadió a cada una de las muestras fueron:

Tabla 34. Cantidad de plásmido añadido en las diferentes transfecciones realizadas.

Cantidades	
PCADN3	1200,00ng
PCADN3-G6P	1200,00ng
CMVB	300,00ng
pCpG-shx	4800,00ng

NOTA: Para poder realizar suficientes transfecciones se realizaron cultivos y *Midipreps* de las células guardadas a -80C. Para ello, en el momento de cultivo, en lugar de picar una colonia, utilizando una punta estéril, se rascó la superficie de la mezcla de células y glicerina y se introdujo en el *Erlenmeyer* de 250ml.

Dónde:

- pcADN3-G6Pasa: Constructo plasmídico capaz de sobreexpresar la G6Pasa.
- CMVB: Plásmido comercial que sirve para valorar la calidad de la transfección.
- pCpG-shx: Constructo plasmídico capaz de inhibir la G6Pasa.

Tras 48h, se extrajo el ARN mediante el *ARN isolation KIT* y se midieron las concentraciones para el posterior cálculo de las cantidades para la retrotranscripción. Finalmente se realizaron las qPCRs pertinentes a partir de la mezcla de la **Tabla 19**. Se prepararon 40 µl de mezcla para realizar 2 replicados de 18µl (2µl de margen).

Para cada uno de los ensayos se realizaron 3 qPCR, cuya diferencia se encontraba en los oligonucleótidos empleados para su amplificación:

- CO1701 y CO1702: Oligonucleótidos para la expresión de la G6Pasa.
- JDRTpcmvbS y HDRTpcmvbAS: Oligonucleótidos para control de CMVB. Mediante este ensayo, con posterior tratamiento matemático, se pudo normalizar los valores de amplificación de la G6Pasa según la calidad de la transfección.
- JDRTHPRTs y JDRHPRTAs: Oligonucleótidos para control de HPRT. Mediante este ensayo, con posterior tratamiento matemático, se pudo normalizar los valores de amplificación de la G6Pasa según el número de células de cada pocillo.

Además, en cada uno de las 3qPCRs realizadas por ensayo, se añadió una muestra de AguaMiliQ (junto con todos los reactivos de la **Tabla Tabla 19**) que se utilizó como blanco.

El resultado de dichas qPCR mostraba gráficos como los siguientes:

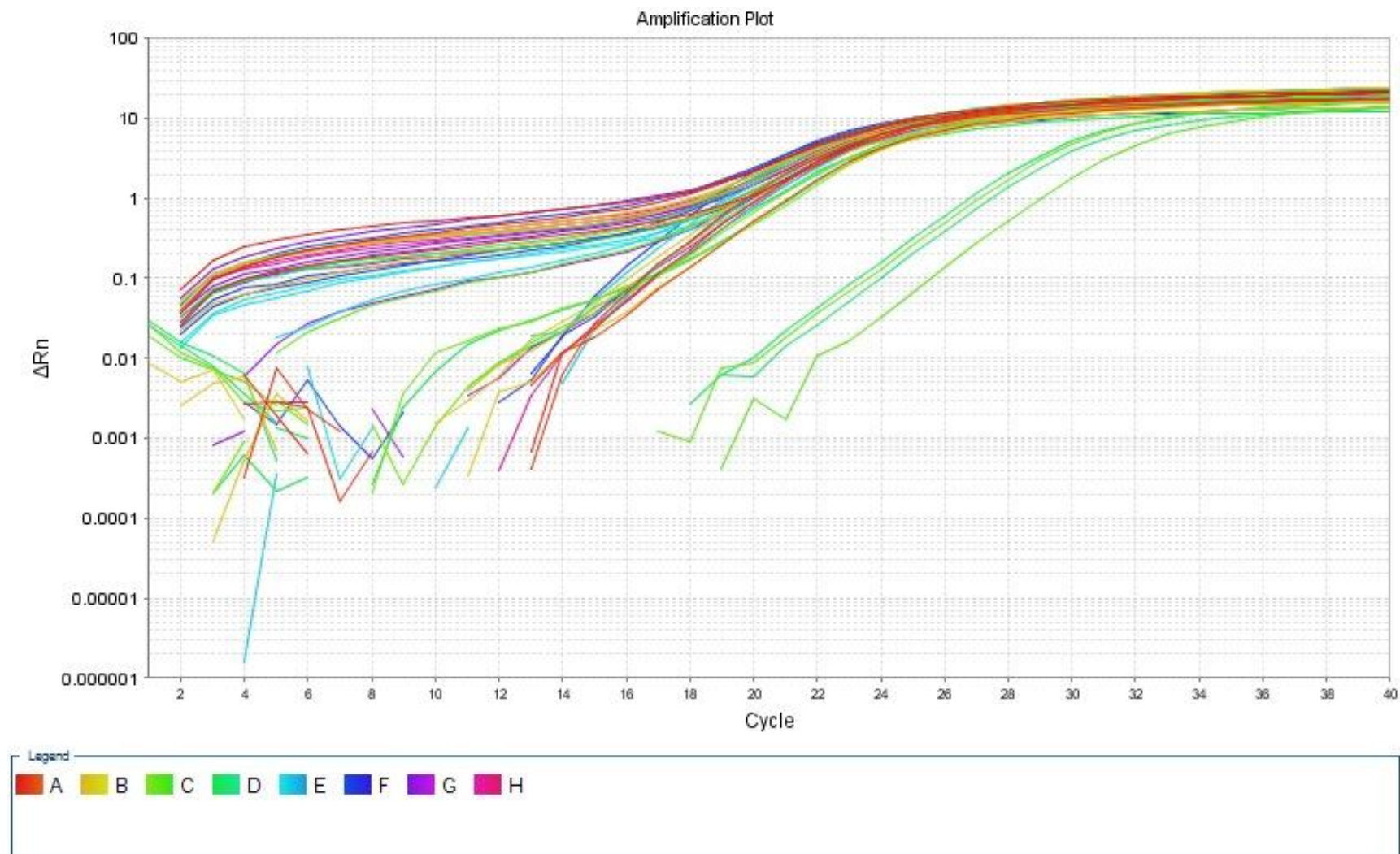


Figura 26. Ensayo 1. Amplificación de HPRT mediante los oligonucleótidos JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs.

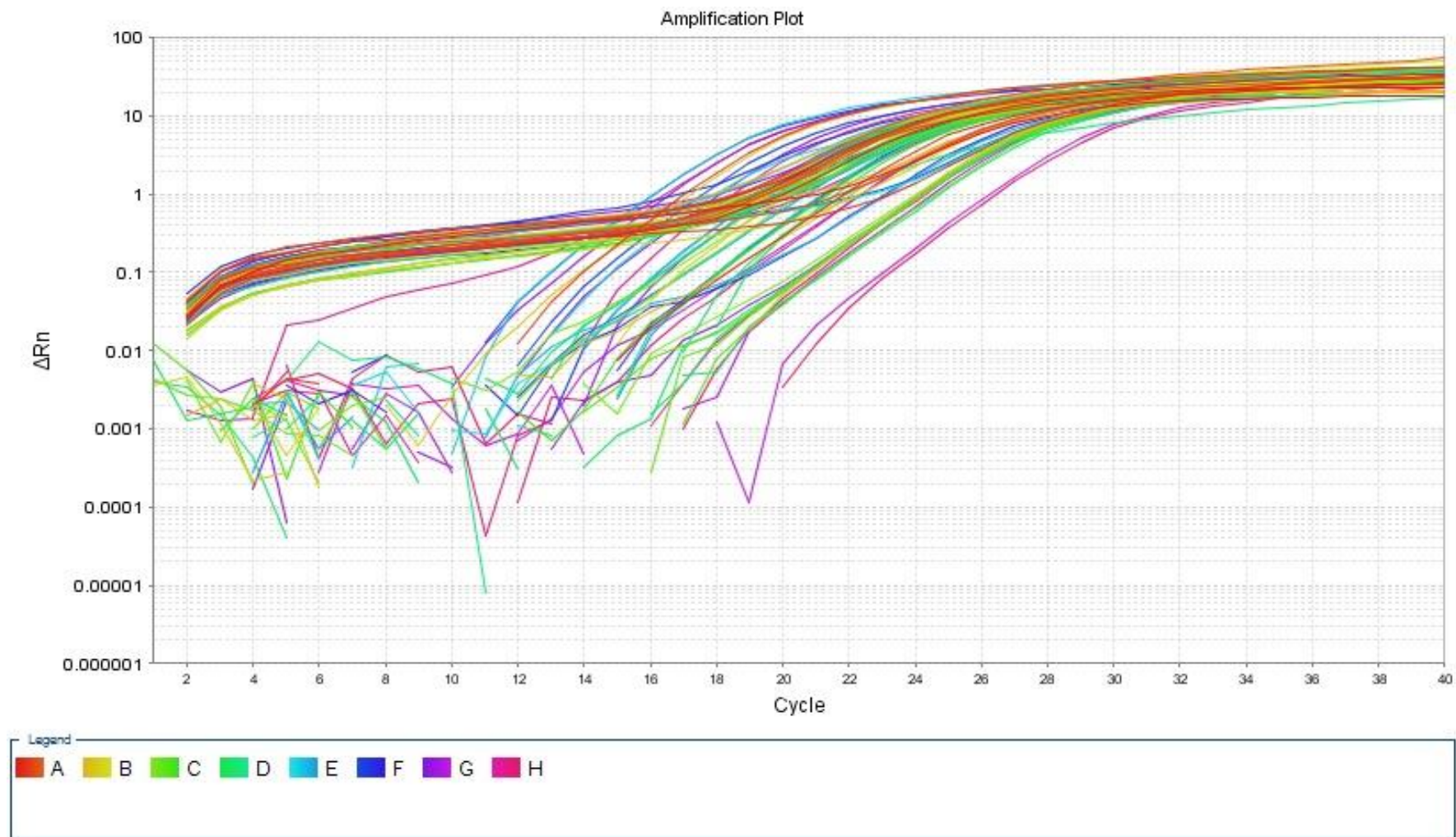


Figura 27.Ensayo 1. Amplificación de la Glucosa- 6 -Fosfatasa y CMVB mediante los oligonucleótidos CO1701 y CO1702 (G6Pasa) y JDRTpcmvBAS y JDRTpcmvBs (CMVB).

En ambos gráficos se pueden observar dos fenómenos diferentes:

- Hay 4 líneas (Figura 26. **Ensayo 1. Amplificación de HPRT mediante los oligonucleótidos JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs.** Figura 26) y 2 líneas (Figura 27) notablemente separadas del resto. Estas líneas son el blanco (Agua MiliQ) que indican que la amplificación ha sido más tardía que la de los otros conjuntos de cADN.
- Hay muestras cuya amplificación se realiza en los primeros ciclos de la qPCR. Esto quiere decir que la concentración de plásmido es mayor en estas muestras. Esto no implica una variación en los resultados ya que todos los resultados son normalizados bajo un mismo valor.

Los valores numéricos de la qPCR se encuentran adjuntos en el *ANEXO 5: Resultados qPCR*.

NOTA: Para obtener una mejor representatividad de los niveles de expresión de los genes analizados se realizó la media geométrica de la expresión de los genes endógenos utilizados y posteriormente se utilizó este valor para obtener el ΔCt .

Se realizaron dos normalizaciones de los datos obtenidos por *qPCR*:

- Normalización de la G6Pasa: En este caso se evaluaron los resultados de la *qPCR* de manera individual con el objetivo de observar la tendencia real de los plásmidos en el ensayo realizado, sin valorar el efecto de las células y la cantidad de transfección.
- Normalización total: En este caso se estudia la respuesta de la inhibición/sobreexpresión bajo una misma cantidad de células y calidad de transfección.

Se realizaron tres ensayos distintos para estudiar la calidad de la inhibición.

Las cantidades de transfección, así como los resultados obtenidos por qPCR y tratamiento de los respectivos datos son:

Ensayo 1

Tabla 35. Ensayo 1: Cantidades de plásmido transfectadas en cada uno de los replicados.

	No tratada	pCpG· shARN ₁	pCpG· shARN ₂	pCpG· shARN ₃	pCpG· shARN ₄	pcADN ₃ ·G6Pasa
shARN ₁	-	4800 ng	-	-	-	-
shARN ₂	-	-	4800	-	-	-
shARN ₃	-	-	-	4800 ng	-	-
shARN ₄	-	-	-	-	4800 ng	-
pcADN ₃ ·G6Pasa	-	1200ng	1200ng	1200	1200ng	1200ng
cmvB	300ng	300ng	300ng	300ng	300ng	300ng

En este primer ensayo se añadió también un replicado con pcADN₃ que actuó como *No tratada* pero en lugar de no añadir nada se añadieron 1200ng de pcADN3 sin el inserto. El gráfico representativo de los datos obtenidos son los siguientes:

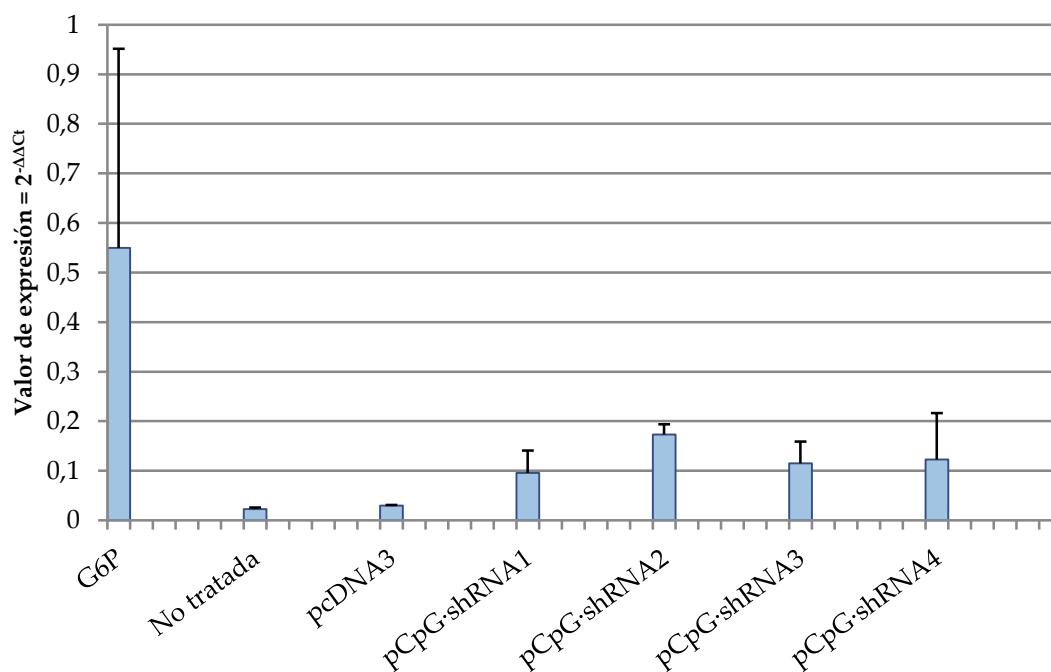


Figura 28. Ensayo 1. Normalización de la Glucosa- 6 -Fosfatasa.

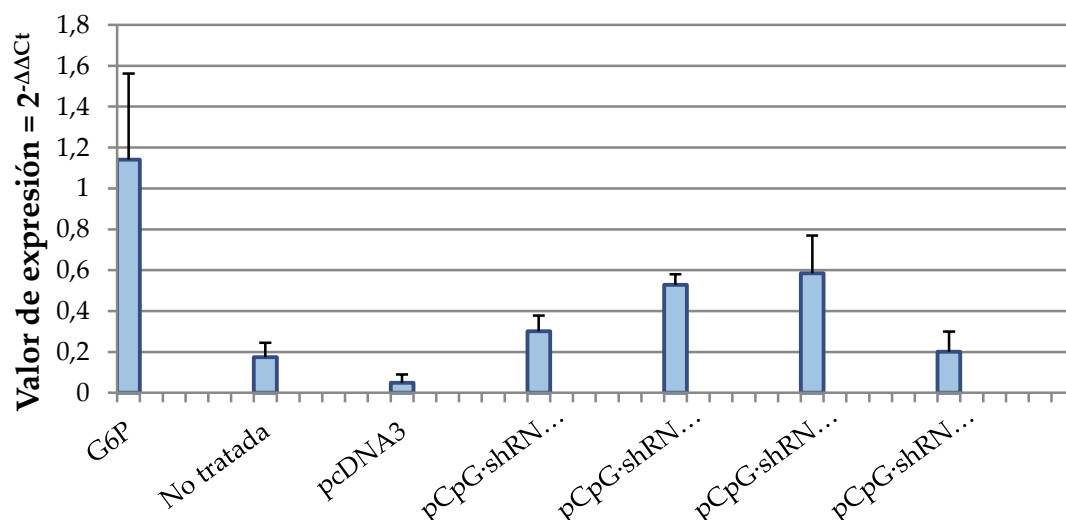


Figura 29. Ensayo 1. Normalización de resultados de G6Pasa con HPRT y CMVB. Normalización total.

Mientras las células que tan solo contenían el plásmido para sobreexpresar la G6Pasa respondieron en la cuantificación con una gran cantidad de ADN que sintetizaba dicha enzima, aquellas que presentaban plásmido para su redujeron más de la mitad su expresión. Asimismo, los dos blancos utilizados en este ensayo presentaron niveles de expresión por debajo de los de la inhibición.

Ensayo 2

Tras observar un correcto funcionamiento del plásmido de expresión y de inhibición se realizó un segundo ensayo para confirmarlo. Para este ensayo se emplearon las mismas cantidades de plásmido en cada una de las transfecciones.

Tabla 36. Ensayo 2: Cantidades de plásmido transfectadas en cada uno de los replicados.

	No tratada	pCpG·shARN ₁	pCpG·shARN ₂	pCpG·shARN ₃	pCpG·shARN ₄	pcADN ₃ ·G6Pasa
shARN ₁	-	4800 ng	-	-	-	-
shARN ₂	-	-	4800	-	-	-
shARN ₃	-	-	-	4800 ng	-	-
shARN ₄	-	-	-	-	4800 ng	-
pcADN ₃ ·G6Pasa	-	1200ng	1200ng	1200	1200ng	1200ng
cmvB	300ng	300ng	300ng	300ng	300ng	300ng

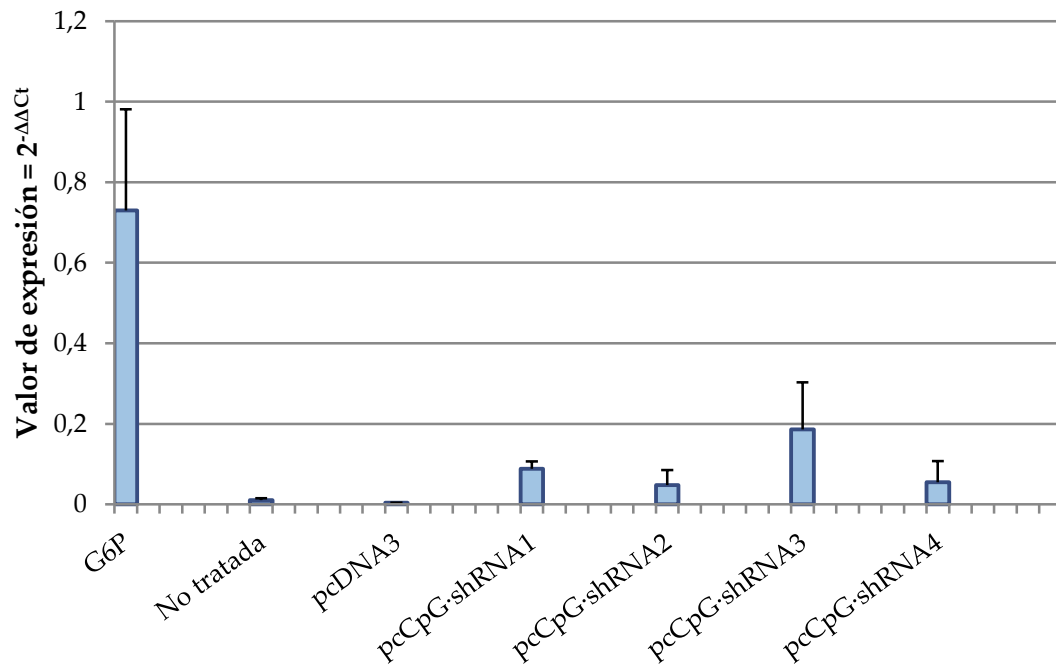


Figura 30. Ensayo 2: Normalización de la Glucosa- 6 -Fosfatasa .

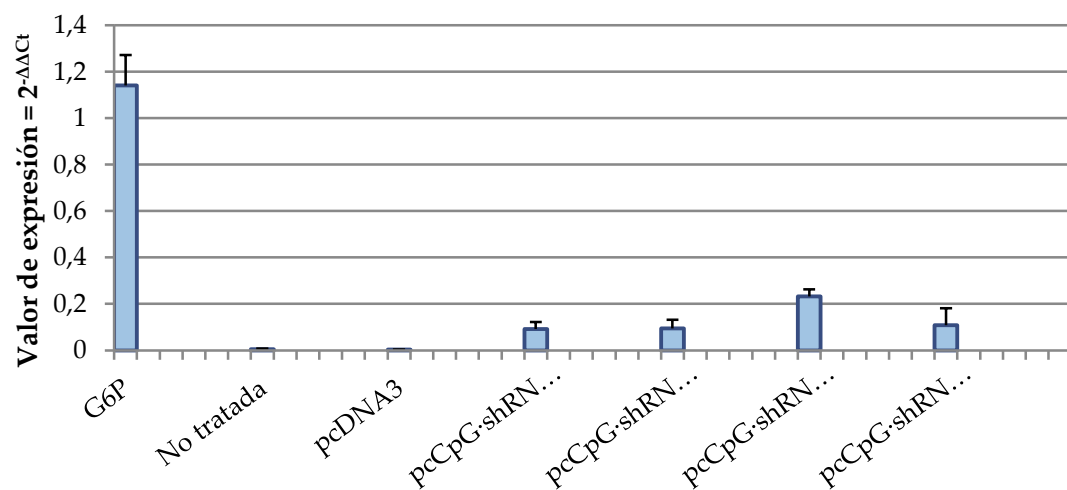


Figura 31 .Ensayo 2. Normalización de resultados de G6Pasa con HPRT y CMVB. Normalización total.

En este caso la inhibición fue más notable que en el Ensayo 1, mostrando para una sobreexpresión similar de la G6Pasa, mayor inhibición de todos los plásmidos implicados. Los blancos de este ensayo resultaron prácticamente 0 para ambas normalizaciones.

A pesar de los resultados positivos obtenidos se decidió realizar un estudio extra de la relación que hay entre la cantidad de plásmido añadido a las células y el nivel de inhibición. Por

cantidades de muestra y resultados obtenidos se trabajó con el pCpG-shARN₁. En este ensayo se realizaron diferentes transfecciones cuyos componentes eran los mismos, variando la cantidad de plásmido inhibidor añadido. Las cantidades añadidas fueron las siguientes:

Tabla 37. Ensayo 3: Cantidades de plásmido transfectadas en cada uno de los replicados.

	No tratada	pCpG· shARN _{1.1}	pCpG· shARN _{1.2}	pCpG· shARN _{1.3}	pCpG· shARN _{1.4}	pCpG· shARN _{1.5}	pcADN ₃ ·G6Pasa
shARN ₁	-	12 ng	120 ng	1200 ng	4800 ng	9600 ng	
pcADN ₃ ·G6Pasa	-	1200ng	1200ng	1200 ng	1200ng	1200 ng	1200ng
cmvB	300ng	300ng	300ng	300ng	300ng	300ng	300ng
BlueScript	0 ng	840000ng	84000ng	8400ng	4800ng	0ng	0 ng

La elección de estas cantidades se hizo de manera arbitraria, previendo que las dos primeras mezclas no producirían inhibición ninguna y se podrían tomar como blancos.

Como en este caso no se pretendía visualizar si se producía o no inhibición, sino que se quería cuantificar a partir de que cantidad de plásmido ésta se producía, se consideró necesario igualar al máximo las condiciones de trabajo de todos los plásmidos implicados añadiendo *BlueScript*, un plásmido comercial que no interactuaba con los plásmidos pero permitía igualar el peso de cada una de las mezclas añadidas, minimizando así el efecto de la diferencia de plásmido a transfectar. La cantidad que se introdujo en cada uno de los pocillos equivalía a la resta entre pCpG-shARN_{1.5} (9600ng) y el plásmido añadir en cuestión.

Finalmente, tras la transcripción y la qPCR, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

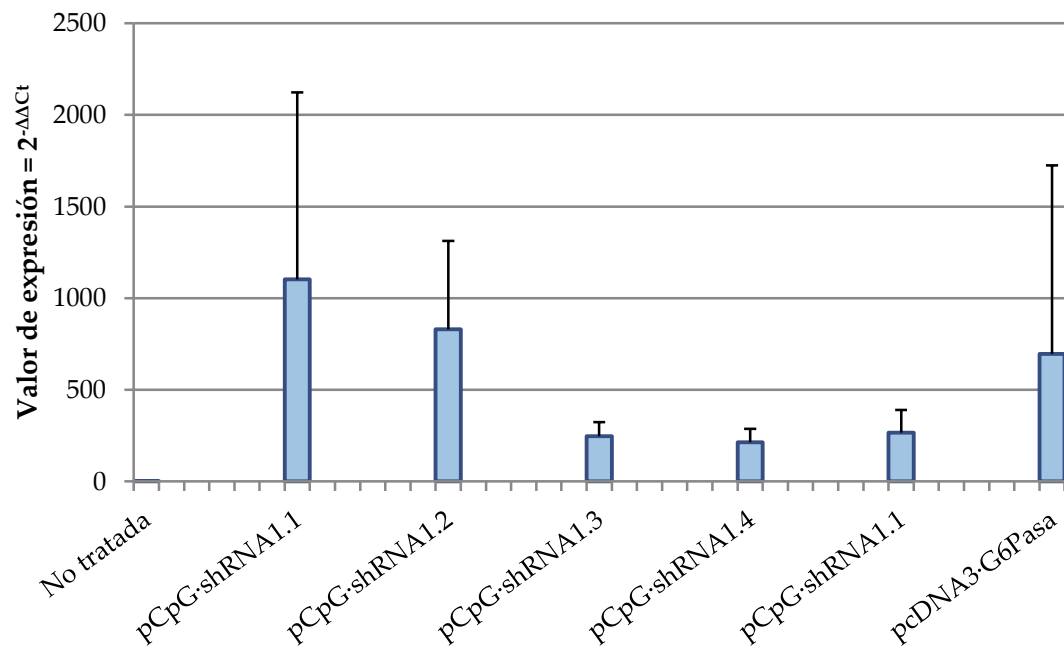


Figura 32. Ensayo 3: Normalización de la Glucosa- 6 -Fosfatasa .

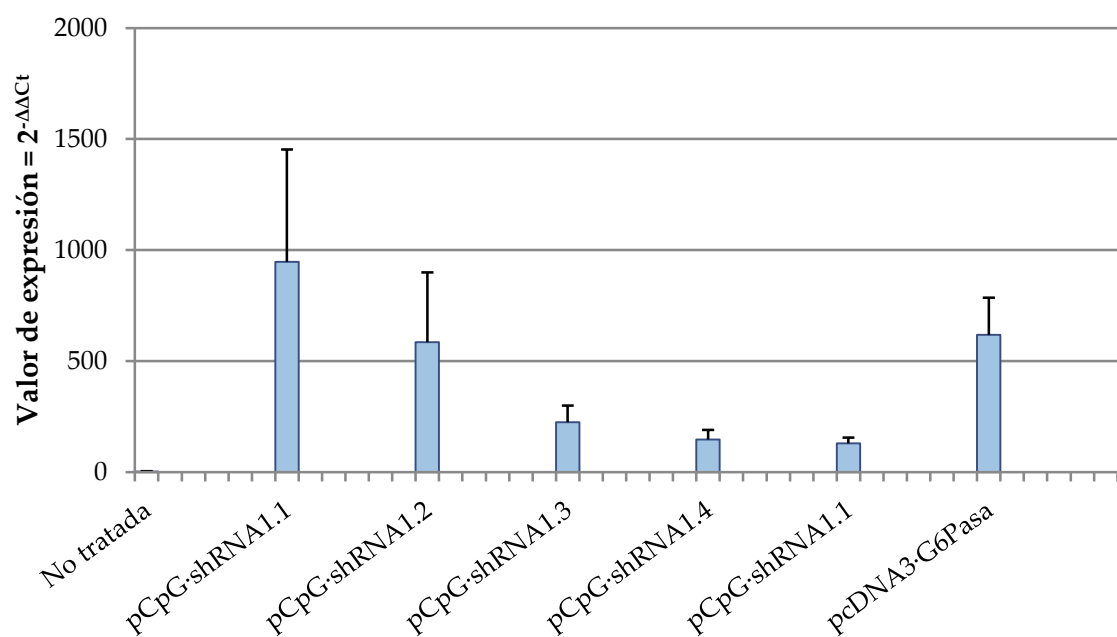


Figura 33. Ensayo 3: Normalización de resultados de G6Pasa con HPRT y CMVB. Normalización total.

Como se puede observar, se volvió a repetir el resultado esperado, presentando una inhibición de la G6Pasa y, además, se observó un descenso gradual de esta expresión a medida que se añadía plásmido a las células. Esta disminución gradual se dio a partir de los 1200ng y se estabilizaba a los 4800ng.

Estudio estadístico

Se ha analizado los resultados obtenidos utilizando una aplicación de estudio estadístico (SPSS), definiendo como variable dependiente los valores de -AACT obtenidos para cada una de las características estudiadas.

Se verifica que existen diferencias significativas para el método Scheffé ($p < 0,05$), clasificando los resultados de la siguiente manera:

Tabla 38. Clasificación post-hoc (método Scheffé) para $p < 0,05$.

No tratado	pcDNA ₃	pcDNA ₃ -G6Pasa	pCpG-sh ₁	pCpG-sh ₂	pCpG-sh ₃	pCpG-sh ₄
b	b	a	b	b	b	b

Capítulo 4. Impacto económico y ambiental

4.1 Impacto económico.

El impacto económico de este proyecto se valora de dos maneras diferentes. Por un lado, se estudiará el coste que ha supuesto la realización de este proyecto (equipos, reactivos, personal, servicios externos y consumo energético y de agua) y, por el otro, se comparará la diferencia de costes una vez aplicado el cambio de dieta, pasando de una dieta rica en proteínas a una rica en carbohidratos vegetales.

4.1.1 Coste del proyecto

Se ha calculado de manera aproximada y resumida el coste que ha supuesto la realización de este proyecto. La división de dichos costes se ha realizado de la siguiente manera:

-Coste de equipos: Se ha tenido en cuenta el coste de cada uno de los equipos instalados, así como de los *softwares* necesarios para su utilización. Además, se ha tenido en cuenta la amortización de estos productos, así como el coste correspondiente al grupo de investigación, teniendo en cuenta la existencia de otros 9 grupos de investigación con los que se comparten algunos de los equipos (**ANEXO 7: Presupuesto**). Para calcular el coste de cada uno de los equipos se ha seguido la siguiente expresión:

$$\text{Coste amortizacion unitario} = \frac{\frac{\text{Coste ud. (€)}}{T \text{ amortización (meses)}}}{T \text{ de proyecto} \cdot \text{Uso}}$$

Dónde:

- Coste ud. : Coste de una unidad del equipo.
- T amortización: Tiempo medio de amortización de los equipos. Se ha considerado que para todos los utilizados, el tiempo es de 10 años.
- T proyecto: Duración del proyecto (8 meses).
- Uso: Número de personas que utilizaron los equipos, contemplando tanto el uso del propio laboratorio (8) como el uso de todos los investigadores en aquellas máquinas comunes (57).

- Coste de reactivos: En este grupo se han incluido todos los reactivos empleados durante los ensayos, así como la compra de los oligonucleótidos y shARNs diseñados y los KITS empleados en ciertos puntos del proyecto. En este caso, tan solo se ha aplicado un 35% de amortización a las células y bacterias utilizadas durante el proyecto, ya que a partir de su conservación a -80°C y posterior tratamiento, si se les da un buen uso se pueden utilizar tantas veces como sea necesario.

- **Coste del personal:** En el cálculo de presupuesto del personal se ha tenido en cuenta que todos los ensayos y seguimientos se han realizado conjuntamente entre un estudiante no titulado de grado (dedicación total) y un Doctorado contratado en el departamento (dedicación parcial). Se ha aplicado el sueldo por convenio (Documento BOE-A-2016-4705) para ambos tipos de trabajadores. Además, se han tenido en cuenta las horas dedicadas por los dos tutores de este proyecto, teniendo en cuenta su tiempo empleado para la organización, corrección y resolución de dudas.

- **Coste energético y agua:** En este caso, dada la dificultad de calcular el gasto energético y de agua que ha supuesto el proyecto, debido a su duración y que el laboratorio se encuentra dentro de uno de los departamentos de la propia Universidad de Barcelona, se ha considerado que el coste ha sido un 5% del coste total del proyecto. Además, el valor final se ha dividido entre le número de investigadores del grupo de laboratorio.

Finalmente, el coste resumido que ha supuesto la realización del proyecto ha sido el siguiente:

Tabla 39. Resumen de costes proyecto.

Coste	Coste total	Coste + IVA	Descuento por material	Coste total
Equipos e instrumentos	142.909,30 €	172.920,26 €	-	452,52 €
Material de laboratorio		500,00 €	50%	250,00 €
Reactivos, enzimas y KITS	8.329,75 €	10.079,00 €	70%	3.023,70 €
Personal y Servicios		13.966,30 €	-	13.966,30 €
SUBTOTAL	151.739,05 €	182.999,26 €		17.692,52 €
Costes energéticos			5% total	126,38 €
TOTAL				17.692,52 €

El desglose del coste se encuentra en el **ANEXO 7: Presupuesto**.

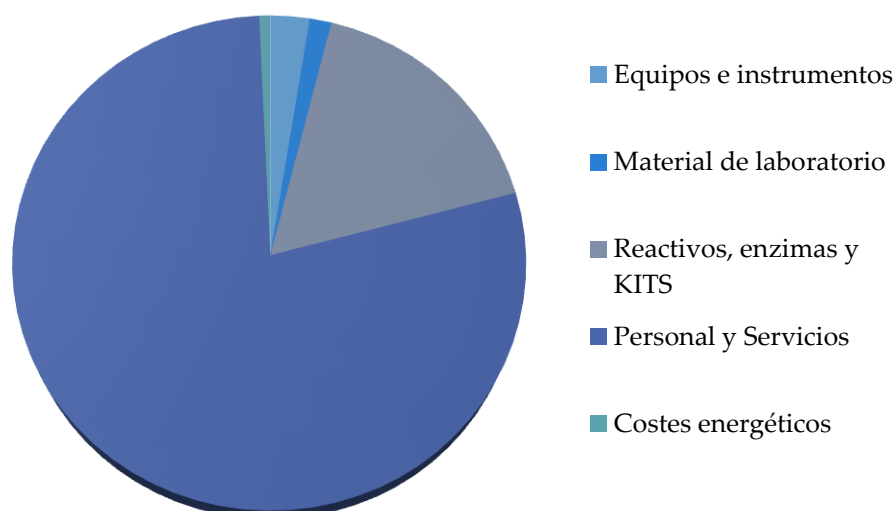


Figura 34. Distribución de costes para presupuesto de proyecto.

Como se puede observar, el grupo que requiere mayor inversión es el del personal y servicios (80%), donde se incluyen los sueldos de las personas que han desarrollado este proyecto, los servicios de limpieza y el suministro de energía.

4.1.2 Implementación del estudio

Como se ha comentado en el apartado *Introducción*, el grupo de Investigación del Dr. Isidoro Metón se centra en la investigación de alternativas a una dieta proteica, realizando tanto estudios *in vitro* como *in vivo*. Durante el 2016, se llevaron a cabo estudios *in vivo* (permitiendo realizar diversas tesis doctorales¹⁶) en los que se modificaba la dieta suministrada a los peces durante su crecimiento. Para elaborar una previsión del impacto económico que tiene la modificación de la dieta, se supondrá que se trabajará de la misma manera:

Tras una semana de aclimatación en las instalaciones en que los peces fueron alimentados a saciedad¹⁷ con la dieta Microbaq 15 (Dibaq Grupo, España) los juveniles de dorada fueron pesados y separados en acuarios a razón de 20-25 peces/acuario. A partir de este momento a cada acuario se suministraba una de las dietas a estudiar. Cada 7-10 días los peces se pesaron a fin de adaptar la ración de dieta que les correspondía.

Siguiendo la misma premisa, se les alimentaría con la misma proporción de los componentes. En el caso de la dieta rica en proteínas (HLL) y en la de carbohidratos (LLH) serían los siguientes:

¹⁶ Análisis transcriptómico para identificar genes biomarcadores del estado nutricional en la dorada (*Sparus aurata*): efecto de la sobreexpresión hepática de *SREBP-1a* del ya titulado Dr. Silva Marrero y Regulación transcripcional y efecto metabólico de la silenciación génica de la glutamato deshidrogenasa en dorada (*Sparus aurata*) del también ya titulado Dr. Gaspar.

¹⁷ Niveles para cada macromolécula (en orden, Proteína, Lípido, Carbohidratos). Diferenciados en High (H) y Low (L).

Tabla 40. Porcentaje de producto para una ración de comida.

	Proteínas	Carbohidratos
	HLL	LLH
Harina de pescado (Prot)	81,62%	54,35%
Almidón (Carb.)	15,00%	37,06%
Aceite de pescado (Prot)	0,76%	5,97%
Otros	2,62%	2,62%
Energía Bruta (KJ/g dw)	20,10	19,90

Como se puede observar, se rebajaría la cantidad de harina de pescado suministrada (27,27%), aumentando mayormente las cantidades de Almidón pregelatinizado (Fuente de carbohidratos) y en menor medida la cantidad de Aceite de Pescado (aumentándolo un 5,21%).

Asimismo, para vehicular ADN plasmídico hacia el interior de las células del tejido hepático de dorada, sería necesario añadir a la dieta las nanopartículas de quitosán-TPP. El coste de su producción y tratamiento se tiene en consideración para la elaboración del presupuesto.

Siendo la necesidad de reducir el consumo de Harina de Pescado y Aceite de Pescado, debido a su precio y baja sostenibilidad, el principal objetivo de este proyecto, los valores del coste de la materia prima para éstos son los precios que tendrían (según *Index Mundi*) si la aplicación del proyecto se hiciese durante 2018.

Coste materia prima¹⁸

Tabla 41. Coste de la materia prima para la elaboración de pienso para la alimentación de una dorada.

	25kG
Harina de pescado	33,75 €
Almidón de maiz pregelatinizado	100,65 €
Aceite de pescado	346,38050 €

Tanto el coste de la dieta comercial como el de los suplementos que se le añaden a la dieta (Otros) se consideran despreciables ya que se mantienen constantes para ambos tipos de dieta.

Considerando que las cantidades (% de componente en la formulación) fueron las mismas durante el desarrollo del estudio se puede realizar una aproximación del coste que tendría una dieta HLL y LLH simulando un sistema de producción intensiva (57% piscifactorias de España se dedican a este método de alimentación) en el que se alimenta a los peces 3 veces al día. Se calculará el coste de alimentación de las doradas durante el último mes de crecimiento (peso prácticamente constante), suponiendo que ingieren el 5% de su peso (17,5g).

Se calculará el coste para una producción de 1.000 doradas anuales.

$$\text{Producción} = \% \text{ componente} \cdot g \text{ total} \cdot \text{periodicidad alimentación} \cdot \text{tiempo}$$

Tabla 42. Cantidad de producto para la alimentación de 1000 doradas durante un mes. 3 veces por día.

	HLL		LLH	
	1 dorada	1.000d	1 dorada	1,000 d
Harina de pescado	14,28g	1285,52Kg	9,51g	856,01Kg
Almidón	2,63g	236,25Kg	6,49g	583,70Kg
Aceite de pescado	0,13g	11,97Kg	1,04g	94,03Kg

¹⁸ Precio de la materia prima en 2016 según *Index Mundi*.

Finalmente, mediante la expresión siguiente, se calculará el precio final de la producción. En el caso de la dieta LLH, se añade un 10% al *subtotal* en representación al coste extra que supone el tratamiento de las doradas, la producción del quitosan TTP etc.

$$\text{Coste final}_{HLL} = \left(\frac{\text{Kg totales} \cdot \text{Precio 25Kg}}{25} \right)$$

$$\text{Coste final}_{LLH} = \left(\frac{\text{Kg totales} \cdot \text{Precio 25Kg}}{25} \right) + 0,10 \cdot \left(\frac{\text{Kg totales} \cdot \text{Precio 25Kg}}{25} \right)$$

Tabla 43. Cantidad y coste para la cría de 1.000 doradas.

	HLL		LLH	
Harina de pescado	1285,52Kg	2.056,82 €	856,01Kg	1.369,62 €
Almidón	236,25Kg	951,14 €	583,70Kg	2.349,96 €
Aceite de pescado	11,97Kg	165,85 €	94,03Kg	1.302,77 €
SUBTOTAL	1533,74Kg	3.173,81 €	1533,74Kg	5.022,35 €
Extra (10%)	-	- €	-	502,23 €
TOTAL	1533,74Kg	3.173,81 €	1533,74Kg	5.524,58 €

El coste total se ve incrementado en un 74% respecto al coste de una dieta basada en proteínas.

4.2 Impacto Ambiental

El impacto ambiental previsto de este proyecto tiene dos vertientes diferentes.

Disminución del consumo de proteínas cárnicas

Siguiendo las hipótesis planteadas para el estudio económico, se estudia la reducción del consumo de derivados cárnicos para la dieta de doradas, teniendo en cuenta una producción de 1.000 doradas y las cantidades consumidas durante un mes.

Tabla 44. Kg de cada producto para la alimentación de 1.000.

	HLL	LLH
	1.000d	1,000 d
Harina de pescado	1285,52Kg	856,01Kg
Almidón	236,25Kg	583,70Kg
Aceite de pescado	11,97Kg	94,03Kg

Según la dieta propuesta, sustituyendo las proteínas por los carbohidratos se reducen 347,45 Kg del consumo de productos pesqueros entre aceite de pescado y harina de pescado.

Teniendo en cuenta que para la producción de 1Kg de harina de pescado se requiere entre 4,4 y 4,6 Kg de peces silvestres, se obtiene una reducción de 1932,76 Kg de pescado silvestre empleado para la alimentación de la dorada. (C.J. Shepherd y A.J.Jackson JouARNI of Fish Biology (2013) 1046-1066)

Este cálculo se ha realizado simulando una producción de 1.000 doradas durante un mes. Si se extrapola a los valores de producción de España (por ejemplo) durante 2017, que fueron de 16231000,00Kg, es decir, 46374285,71 doradas (suponiendo un peso medio de 350g), se obtiene una reducción del consumo de 221309,69 Kg de pescado.

Cabe destacar que el cálculo se ha realizado suponiendo tan solo la cría durante el último mes de crecimiento y considerando el peso mínimo comercial de la dorada. Las cifras de ahorro serían mucho mayores si se tuviese en cuenta que la dorada comercial (de piscifactoría) puede llegar a pesar hasta 1 Kg, aumentando así su consumo de harina de pescado.

La reducción del consumo de pescado para la producción de Harina de Pescado supondría una gran ayuda a las industrias acuícolas y, sobretodo, durante períodos de inestabilidad ambiental

(huracanes, tormentas...) en los que la cantidad de peces para su producción se puede ver considerablemente reducida.

Diminución de contaminación por compuestos nitrogenados

Eutrofización: “Proceso natural en ecosistemas acuáticos, especialmente en lagos, caracterizado por un aumento en la concentración de nutrientes como nitratos y fosfatos, con los consiguientes cambios en la composición de la comunidad de seres vivos. Las aguas eutróficas en contraste con las oligotróficas son más productivas. Sin embargo, más allá de ciertos límites, el proceso reviste características negativas al aparecer grandes cantidades de materia orgánica cuya descomposición microbiana ocasiona un descenso en los niveles de oxígeno.”

-GreenFacts.org

Históricamente se ha considerado que este hecho se debe sobre todo a la presencia de Fósforo y Carbono en los medios acuáticos. Sin embargo, durante las pasadas dos décadas, tras diversos estudios de ecosistemas costeros han mostrado la importancia del nitrógeno en este efecto, llegando a ser el principal causante de este fenómeno en algunos lugares de la Tierra. (Robert W. Howarth y Roxanne Marino, 2006).

Actualmente se considera que los mayores causantes de dicho fenómeno son:

- Contaminación agropecuaria (contaminación de los suelos y de los acuíferos con fertilizantes inorgánicos) y excrementos de animales a causa de una producción masiva.
- Contaminación forestal.
- Contaminación atmosférica.
- Contaminación urbana (efluentes urbanos).

Una de las peculiaridades que tienen los peces debido a su metabolismo es que son amoniotélicos, es decir, debido a su metabolismo basado en la ingesta de proteínas, excretan desechos nitrogenados, como el amoníaco, haciendo que se consideren una de las mayores causas de eutrofización.

Ante el creciente aumento de consumo de pescado y, por lo tanto, de su producción, diversos autores han estudiado cuales son los factores que llevan a un aumento o disminución de la

excreción de dichos nutrientes. Mientras algunos autores definen que los niveles están claramente relacionados con la alimentación (Muir, 1994) y que paralelamente, otros aspectos como el medio o el estado del desarrollo del pez, así como la temperatura del agua pueden influir, otros autores justifican la variación de excreción en otros aspectos como la duración del fotoperíodo (Rychly y Marina, 1987) o la frecuencia de alimentación (Ramnarine, 1987).

A pesar de las diferencias, el Dr. Martínez López, Roberto realizó el 2002 una interesante investigación en cuanto al caso específico de la dorada. En su tesis *Efecto de la dieta y otros factores sobre la excreción de amonio y el aprovechamiento del nitrógeno por la Dorada S. aurata y su incidencia en los cultivos de esta especie* ya hizo un pequeño avance de las consecuencias de un cambio de dieta de proteínas a carbohidratos. Los resultados de su tesis en cuanto al cambio de dieta, fueron los siguientes:

- Las tasas de excreción encontradas variaron entre 450 y 500mg N-NH₄⁺/kg·pez·día para las doradas menores de 45g. Por otro lado, aquellas que pesaban de entre 115 a 150gramos, la excreción fue de 116,3 mg N-NH₄⁺/kg·pez·día. Las mayores tasas de excreción se dan durante el día, con especial relación con la alimentación y temperatura.
- Se presentó ahorro proteico cuando parte de la energía proveniente de proteínas fue sustituida por carbohidratos. Al aumentar la cantidad de carbohidratos, no solo se redujeron niveles de excreción de amonio, sino que se incrementó la retención de proteínas para el crecimiento.
- Alimentar las doradas a saciedad mejoró la distribución del nitrógeno absorbido, orientándolo principalmente para el crecimiento y sacrificando la acumulación de proteínas corporales. Aún así, las tasas de excreción se incrementaron.

Capítulo 5. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas tras este proyecto han sido las siguientes:

1. Se ha diseñado un constructo plasmidico capaz de sobreexpresar la G6Pasa en células HEK 293A. Mediante qPCR se ha comprobado su correcta actividad.
2. Se han diseñado 4 “constructos” plasmídicos capaces de inhibir la G6Pasa en células HEK 293A. Su correcto funcionamiento ha sido comprobado mediante qPCR. El tratamiento estadístico por comparaciones múltiples (Scheffé) verifica dicho comportamiento.

Se ha considerado necesario destacar las siguientes diferencias mostradas en los tres ensayos realizados:

2.1 Los tres ensayos presentan resultados similares, aun así el *Ensayo 2* y *Ensayo 3* son los que presentan mayor fiabilidad debido a que aquellas células a las que no se les introdujo plásmidos para sobreexpresar/inhibir no presentaron prácticamente reacción ante los oligonucleótidos de G6Pasa. Las reacciones resultantes se atribuyen a errores durante la manipulación de las muestras.

2.2 Los plásmidos que presentan mayor inhibición son el pCpG-shARN₁ y pCpG-shARN₂. Debido a que estos ensayos se realizan sobre organismos vivos no es posible asegurar un porcentaje de inhibición, para ello sería necesario reproducir más veces este ensayo.

2.3 Se intuye a partir del *Ensayo 3* una relación de la respuesta de la expresión de la Glucosa- 6 -Fosfatasa y la cantidad de plásmido añadido. Además, se observa que esta inhibición empieza ser notable (para células) a partir de los 1200ng y ante una mayor cantidad de plásmido los organismos responden de la misma manera (llegan a un punto de saturación).

3. Dado los resultados positivos obtenidos en este proyecto, los plásmidos diseñados se consideran válidos para el siguiente ensayo *in vivo* de la inhibición de la G6Pasa.
4. El coste total para la realización de este proyecto es de 17.692,56€. La inversión que supone la realización de este proyecto recae sobre todo en el coste de personal y

servicios (80%). A su vez, el coste de equipos e instrumentos y material de laboratorio, el cual se preveía como el más elevado, ha resultado menor gracias a que la gran mayoría de los equipos empleados son compartidos con otros departamentos.

5. El impacto futuro que puede generar la aplicación de una dieta rica en carbohidratos generaría un incremento de la inversión en la dieta de la dorada de un 74%. Este incremento se vería compensado por:

- La reducción del uso de 221309,69Kg de pescado para la producción de 100.000 doradas.
- La reducción de la excreción de amonio al medio, reduciendo la eutrofización que ello conlleva.

Capítulo 6. Bibliografía

Artículos

Abro, R. (2014). *Digestion and Metabolism of Carbohydrates in Fish*.

Applied Biosystems. (2010). Relative Standard Curve and Comparative CT Experiments. *Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems*, 1–292.

FAO. (2012). Alimentar Al Sector De La Acuicultura En Crecimiento: Un Análisis. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-mc825s.pdf>

FAO. (2014). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. FAO. <http://doi.org/978-92-5-308275-9> ISSN1020-5500

FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma. <http://doi.org/978-92-5-306675-9>

Fernández González, Felipe Javier; Sierra, J. P. (Joan Pau; *Efecto de la dieta y otros factores sobre la excreción de amonio y el aprovechamiento del nitrógeno por la Dorada S. aurata y su incidencia en los cultivos de esta especie*; <http://hdl.handle.net/2117/93691>

González, J. D., Caballero, A., Viegas, I., Metón, I., Jones, J. G., Barra, J., Baanante, I. V. (2012). Effects of alanine aminotransferase inhibition on the intermediary metabolism in *Sparus aurata* through dietary amino-oxyacetate supplementation. *British Journal of Nutrition*, 107(12), 1747–1756. <http://doi.org/10.1017/S000711451100496X>

Hendriks, W. H., Butts, C. a, Thomas, D. V, James, K. a C., Morel, P. C. a, Verstegen, M. W. a, ... Pedersen. (1997). Use of Fishmeal and Fish Oil in Aquafeeds - Further thoughts on the fishmeal trap. *FAO Fisheries Circular No.*, 975(November), 949–956. <http://doi.org/10.1007/s10705-005-5170-y>

Jain, M. (2011). A next-generation approach to the characterization of a non-model plant transcriptome. *Current Science*, 101(11), 1435–1439. <http://doi.org/10.1371/Citation>

Larrain, F. J. Z. (2002). Las harinas y aceites de pescado en la alimentación acuicola. *Avances En Nutrición Acuicola VI*, 516–526.

Lazzarotto, V., Médale, F., Larroquet, L., & Corraze, G. (2018). Long-term dietary replacement of fishmeal and fish oil in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth,

whole body fatty acids and intestinal and hepatic gene expression. *PLoS ONE*, 13(1), 1–25.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0190730>

Leaver, M. J., Villeneuve, L. a N., Obach, A., Jensen, L., Bron, J. E., Tocher, D. R., & Taggart, J. B. (2008). Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 9, 1–15. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-9-299>

Mart, J. (2015). Distribución y consumo de productos pesqueros. *Distribución Y Consumo*, 3, 32.

Michael P. Gantier, Claire E. McCoy, Irina Rusinova, Damien Saulep, Die Wang, Dakang Xu, Aaron T. Irving, Mark A. Behlke, Paul J. Hertzog, Fabienne Mackay, Bryan R. G. Williams; Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following *Dicer1* ablation , *Nucleic Acids Research*, Volume 39, Issue 13, 1 July 2011, Pages 5692–5703, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr148>

Norambuena, F., Lewis, M., Hamid, N. K. A., Hermon, K., Donald, J. a., & Turchini, G. M. (2013). Fish oil replacement in current aquaculture feed: Is cholesterol a hidden treasure for fish nutrition? *PLoS ONE*, 8(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0081705>

Real, a T. (n.d.). Guía de interpretación de resultados.

Robaina robaina, L. E., Izquierdo López, M. S., Moyano López, J. ; 1995

Uder, S., George, H., & Boedeker, B. (1998). MISSION™ shARN Library: Next Generation ARN Interference. *Order*, 6, 1–6. Retrieved from http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/vol6_iss2_mission_shARN.Par.0001.File.tmp/vol6_iss2_mission_shARN.pdf

Valenzuela B, A., Sanhueza C, J., & de la Barra D, F. (2012). El Aceite De Pescado: Ayer Un Desecho Industrial, Hoy Un Producto De Alto Valor Nutricional. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(2), 201–209. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182012000200009>

Documento BOE-A-2016-4705

Libros y apuntes

Biología 2º Bachillerato; Juan Manuel Velasco, Tomás Romero, Carlos Salamanca, Rafaela López.

Biología celular y molecular; Harvey Lodish; 2005

Biología molecular aplicada; Universidad Complutense de Madrid

Bioquímica, Conceptos esenciales; Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez; 2011.

Bioquímica humana: Curso básico; José M. Macarulla, Félix M. Goñi; 1994

Biotechnology- The Science and the Business; Derek G. Springham, Vivian Moses, Ronald E.Cpe; 1999.

Farmacología y endocrinología del comportamiento; Manuel Sanchez; 2012

Fisiología General; Jesús Merino Pérez y María José Noriega Borge (Universidad de Cantabria).

Introducción a la biología celular; Bruce Alberts, Dennis Bray; 2006

Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y protocolos de trabajo. Bib. Orton IICA/CATIE

PCR: essential techniques; John Wiley & Sons; 1996

RNA and DNA Diagnostics ; Volker A. Erdmann, Stefan Jurga, Jan Barciszewski Springer ; 2015

Páginas WEB

www.es.khanacademy.org/science/biology/biotech-ADN-technology/ADN-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis

<https://www.thermofisher.com/es/es/home.html>

<https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>

https://ec.europa.eu/fisheries/facts_figures_en?qt-facts_and_figures=4

<http://www.doradas.es/la-dorada>

Secuencia G6Pasa

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF151718.1

Capítulo 7. Anexos

7.1 ANEXO 1: Cadena completa de mARN Glucosa- 6 -Fosfatasa de *Sparus Aurata*

LOCUS AF151718 1748 bp mARN linear
VRT 22-FEB-2006

DEFINITION *Sparus aurata* glucose-6-phosphatase mARN, complete cds.

ACCESSION AF151718

VERSION AF151718.1

SOURCE *Sparus aurata* (gilthead seabream)

ORGANISM [Sparus aurata](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;
Neoteleostei; Acanthomorphata; Eupercaria; Spariformes; Sparidae;
Sparus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1748)

AUTHORS Meton, I., Caseras, A., FeARNndez, F. and Baanante, I.V.

TITLE Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mARN levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition JOUARNL Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 138 (2), 145-153 (2004)

PUBMED 15193269

REFERENCE 2 (bases 1 to 1748)

AUTHORS Caseras, A., Vives, C., Meton, I. and Baanante, I.V.

TITLE Glucose-6-phosphatase from liver of the teleost fish (*Sparus aurata*)

JOUARNL Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 1748)

AUTHORS Caseras, A., Vives, C., Meton, I. and Baanante, I.V.

TITLE Direct Submission

JOUARNL Submitted (17-MAY-1999) Bioquímica y Biol. Mol., Facultad de Farmacia, Univ. Barcelona, Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain).

Secuencia:

```

1 agattcagcg cgtcatcctc aggcagaggc tgagccatca tggatcttct gcacagctgg
61 ggggtcgagc tggcgggtcca tctgcagacc acatacagca gctatgaggg cctgttcggc
121 ctggcggtcca ccgtggccga cctgcacacc accttcttct tcttcttccc cttctggttc
181 cacctgcgga gggacaccgg gctccggctc atctgggtgg cggtcctggg agactggctc
241 aacctggtgc tgaatgggt tctgttcggg gagagaccgt actggtgggt tcacgagacc
301 cggttctacg gagcagcgcc ggccccggct ctgcggcagt tcccatcac ctgtgagacc
361 ggaccaggaa gcccgctcggg tcacgccatg ggagcagctg gcgtctggta tgtgatggtc
421 acggcgctgc tcgccacggc gacagagaag agatgccctc ctttattata caggttcttg
481 cagctgggcc tgtgggctct catgggctg ctggtgctg tgggtgcat gtccagggtc
541 tacatggcgg cacactttcc ccatcaggtc atcgctggag tcattacagg cgtattggtg
601 gctgaggtcg tctcgaagga gaagtggatc tacgacgcca gcatgaggaa gtacttccac
661 accaccctct ccttgacctc cctggctgtt ggcttctacc tgctgctcag agttctgggc
721 gtggacctgc tgtggacgat ggagaaagcc cagaagtggg gcgtgaatcc cgagtgggtc
781 cacctggaca gcacgccctt cgccagcctc ctgcgtaaca tgggcaccct gttcggtttg
841 ggtttgggtc ttcactcgcc cctcaacagc gagaccaaga acacaagcac cagcttcaag
901 acgggatgta ttatcgtctc cttgtttctg cttcatctgc tcgacggatg gacattttcc
961 tctgaaaatc tcacgacttt ctacttctg tcttttggtg aaagcgcagt tgctctttta
1021 atcccagcga ctctgggttc cttcgctctc tgctggatcc gtccggggaa gacagaagac
1081 aagaacttgt gattcaggtc cacctttttg ttttaactca gtagtttaat tttctatatt
1141 gtgccaggat cttttgttct catgtttgat tcaaaagaca tgaagacttc caggacaaaag
1201 tocctgaagt gattgtgctg gcctggatat cagctccttt agagaatatg tactgctgtt
1261 taacattttg ggaaatatgc tgatcacttc ctgtcagagt tcgatgaaaa cattgcttcc
1321 actctgatgt cagcagccgg ttagcttagc ttacaggtaa gagcttgtct ggctccgtcc
1381 aaaggtaaaa aaaatccacc aacaaatggc tgtaaaatat gtgaattaac atgttttgtc
1441 tcagttttgt aatttgtaca agaacagaag tattaataatg ccagttaatg gttttataaa
1501 gagttctgtg ttggattttc tcggcagtag tgagctatag aggcgttaga aggtggattt
1561 tgttttcttt ggatggagcc aggctagctg tttccacctg cttccagcct ttgtgctaag
1621 ctaagctaag ctaagctaac tgtctcctgg atcaggctca ggggtgtcag gaatcaaact
1681 gccggctaag ggatgtttat tttcgtttgt attcgatctt cgagggcatc tcttctctgt
1741 cgccgtgg

```

Traducción

```

MDLLHSWGVELAVHLQTTYSSYEGFLGLASTVADLHTTFFFFFP
FWFHLRRDTGLRLIWVAVLGDWLNVLKWLFGERPWWVHETRFYGAAPAPALRQFP
ITCETGPGSPSGHAMGAAGVWVMTALLATATEKRCPLLRYFLQLGLWALMGLLV
VVCMSRVYMAAHFPHQVIAGVITGVLVAEVVSKEKWIYDASMRKYFHTTSLTSLAVG
FYLLLRVLGVDLLWTEKAQKWCVNPEWVHLDSTPFASLLRNMGTLFGLGLGLHSPLN
SETKNTSTSFKTGCIIVSLFLLHLLDGWTFSSENLTTFYFLSFGKSAVALLIPTTLVP
FALCWIRPGKTEDKNL

```

7.2 ANEXO 2: Mapa de los plásmidos empleados

Plásmido pGem - T - Easy

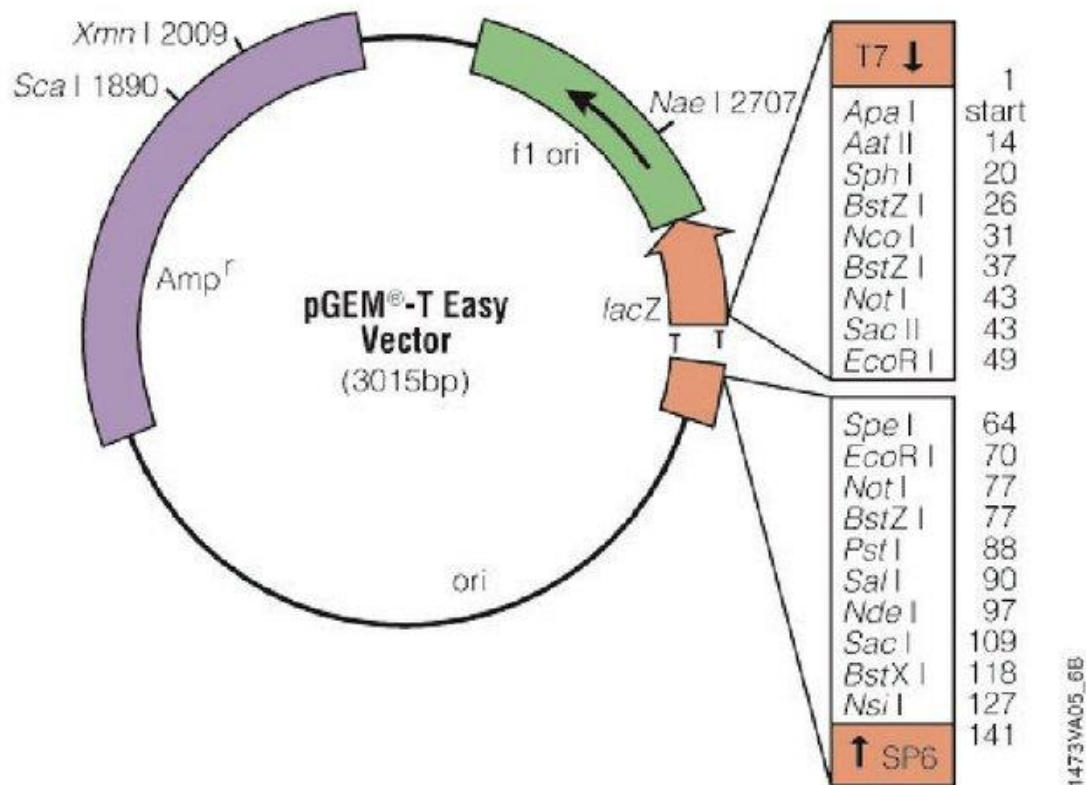


Figura 35. Mapa del plásmido pGem - T -Easy. Imagen extraída de: <https://www.fishersci.ca/shop/products/promega-pgem-t-pgem-t-easy-vector-systems-4/p-127641>

Plàsmido pcADN₃

Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neomycin ORF: bases 2151-2945
SV40 poly A: bases 3000-3372
ColE1 origin: bases 3632-4305
Ampicillin ORF: bases 4450-5310

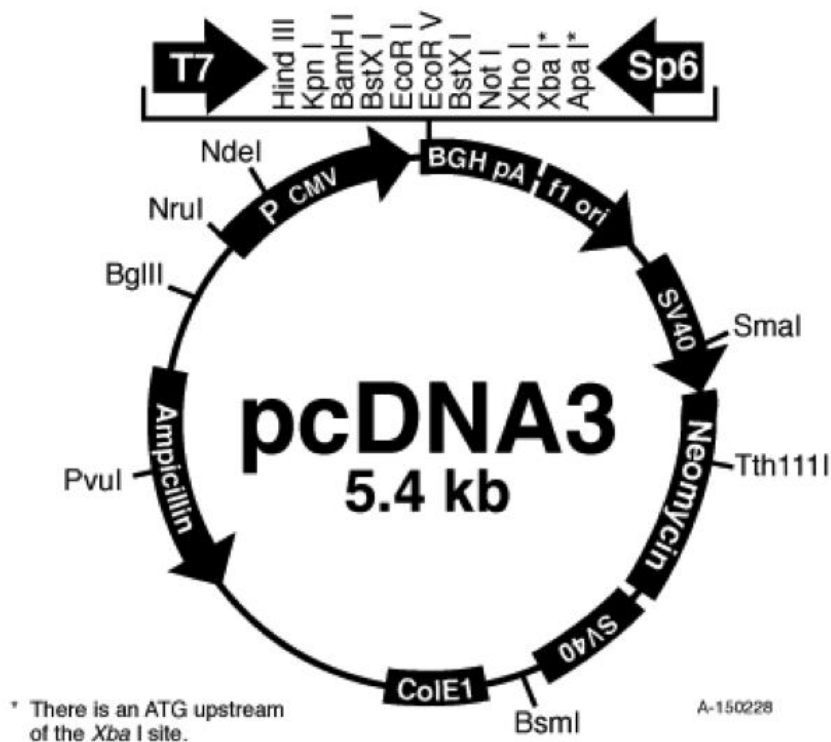


Figura 36. Mapa del plàsmido pcADN₃. Imagen extraída de:

<https://www.addgene.org/75142/>

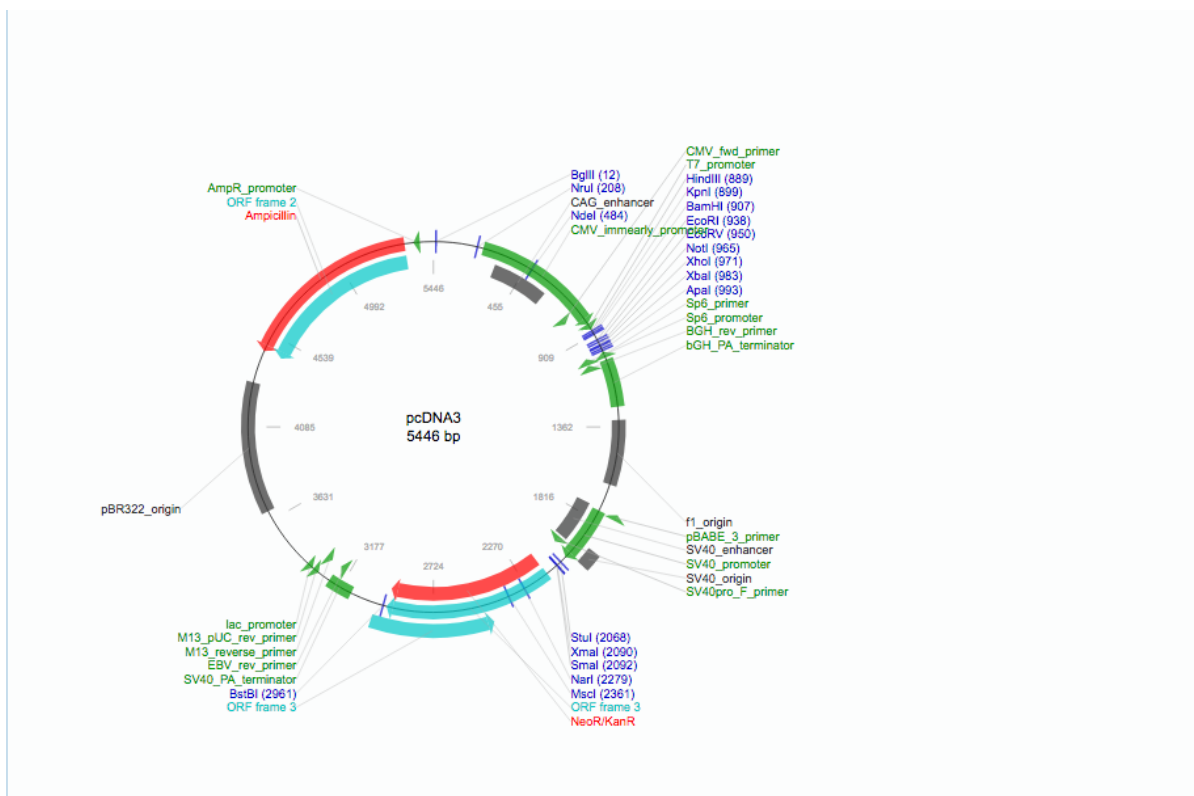


Figura 37. Mapa del plàsmido pcADN3 con la posición exacta de las enzimas de restricción.


Imagen extraída de: https://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2092/

7.3 ANEXO 3: Diseño bioinformático de los oligonucleótidos y shARNs

7.3.1 shARNs



El diseño de shARNs se ha hecho mediante la página *InvivoGen*. Esta página crea diferentes cadenas de cADNs que tras su transcripción darán lugar a shARNs. Estas cadenas las diseña a partir de la cadena de cADN que sintetiza la Glucosa- 6 - Fosfatasa . Esta cadena, introducida en la parte *Conding Sequence* es la adjunta en el

ANEXO 1: Cadena completa de mRNA Glucosa- 6 -Fosfatasa de *Sparus Aurata*.




siRNA Wizard v3.1

SEARCH





[DISTRIBUTORS](#)
[ABOUT US](#)
[CONTACT US](#)



siRNA Wizard's

- Find siRNA sequences
 - Standard search
 - Advanced search
- Design hairpin insert
- Scramble siRNA
- Selection criteria
- siRNA design guidelines



Order

- psiRNA™ vectors
- pCpGfree-siRNA vectors
- Ready-made psiRNA
- Selective Antibiotics

Find siRNA sequences - Standard search

Instructions

1. Enter your siRNA name for reference (optional)
2. Paste the sequence of your target gene. (Spaces and numbers will be ignored)
3. Enter the desired motif size (21 nt by default).
4. If you want to increase the siRNA's specificity by removing non-unique sequences, choose the database corresponding to the target gene. (optional)

Only siRNA presenting homology with less than 5 Unigene sequences are shown, and the list of homolog genes found is displayed
 5. To avoid off target effect, choose miRNA SEED database corresponding to the target gene. (optional)

siRNA Name :

CO0141

Coding Sequence (max: 9600bp):

CAGGACAAAGTCCCTGAAGTGATTGTGCTGGCCTGGATACAGCTCCTTTAGAGAATATGACTGCTGTT

TAACATTTTGGAAATATGCTGATCACTTCTGTGACAGTTCGATGAAACATTGCTTCCACTCTGATGT

CAGCAGCCGCGTTAGCTTAGCTACAGGTAAGAGCTTGTCTGGCTCGCTCAAAGGTAAAAAATCCACC

AACAAATGGCTGTAAAAATGTGAAATTAAGATCTTTTGTCTCAAGTTTGTAAATTTGTACAGAAGACAGAAG

TATTAATATGCCAGTTAATGTTTTATAAAGAGTTCTGTGTGTGATTTCCTGGCAGTAGTAGCCTATAG

AGCGCTTAGAGAGTGGATTGTTTCTTGTGGATGAGCCAGCGTAGCTGTTTCCAGCTCGCTCCAGCCT

TTGTGCTAGCTAGCTAAGCTAAGCTAACTGTCTCCTGGATCAGGCTCAGGCGGTTCAGGAATCAAACT

GCGBGCTAATGGATGTTATTTCCTGTGATTGATCGATCTTGAGGCGCATCTCTCTCTGCTGCGCGTGG

Motif size :

21

nt


mRNA Database :

miRNA SEED Database :

Search

Reset

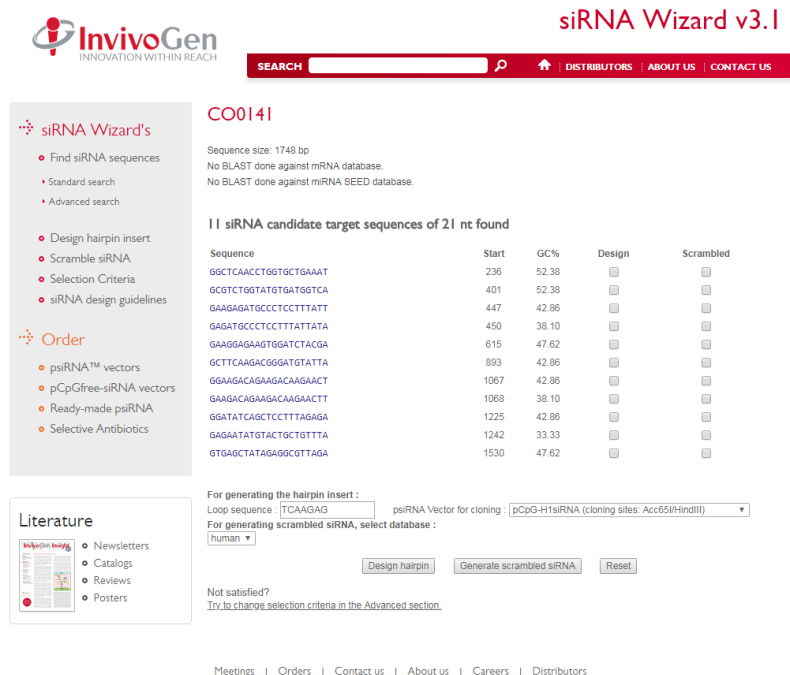
Literature



- Newsletters
- Catalogs
- Reviews
- Posters

Figura 38. Instrucciones diseño de shARNs mediante herramientas bioinformáticas. Paso 1.

Al clicar *Search* aparece la pantalla de la *Figura 39*. **Instrucciones diseño de shARNs mediante herramientas bioinformáticas. Paso 2.**, la cual ofrece la secuencia, el punto de inicio de esta y el % de uniones Guanina - Citosina de ésta.



siRNA Wizard v3.1

SEARCH

↑ DISTRIBUTORS ABOUT US CONTACT US

siRNA Wizard's

- Find siRNA sequences
 - Standard search
 - Advanced search
- Design hairpin insert
- Scramble siRNA
- Selection Criteria
- siRNA design guidelines

Order

- psiRNA™ vectors
- pCpGfree-siRNA vectors
- Ready-made psiRNA
- Selective Antibiotics

Literature

- Newsletters
- Catalogs
- Reviews
- Posters

CO0141

Sequence size: 1748 bp
No BLAST done against mRNA database.
No BLAST done against miRNA SEED database

11 siRNA candidate target sequences of 21 nt found

Sequence	Start	GC%	Design	Scrambled
GGCTCAACCTGGTGTGAAAT	236	52.38	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GCCTCTGTATGTATGTGCA	401	52.38	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GAAGAGATGCCCTCTTTATT	447	42.86	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GAGATGCCCTCTTTATTATA	450	38.10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GAAGGAGAAGTGGATCTACGA	615	47.62	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GCTTCAAGACGGATGTATTA	893	42.86	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GGAGACAGAGACAGAACT	1067	42.86	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GAAGACAGAGACAGAACTT	1068	38.10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GGATATCAGCTCTTTAGAGA	1225	42.86	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GAGAATATGTACTGTGTTTA	1242	33.33	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GTGAGCTATAGAGGCTTAGA	1530	47.62	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

For generating the hairpin insert :
Loop sequence : TCAAGAG psiRNA Vector for cloning : pCpG-H1siRNA (cloning sites: Acc65I/HindIII)

For generating scrambled siRNA, select database :
human

Design hairpin Generate scrambled siRNA Reset

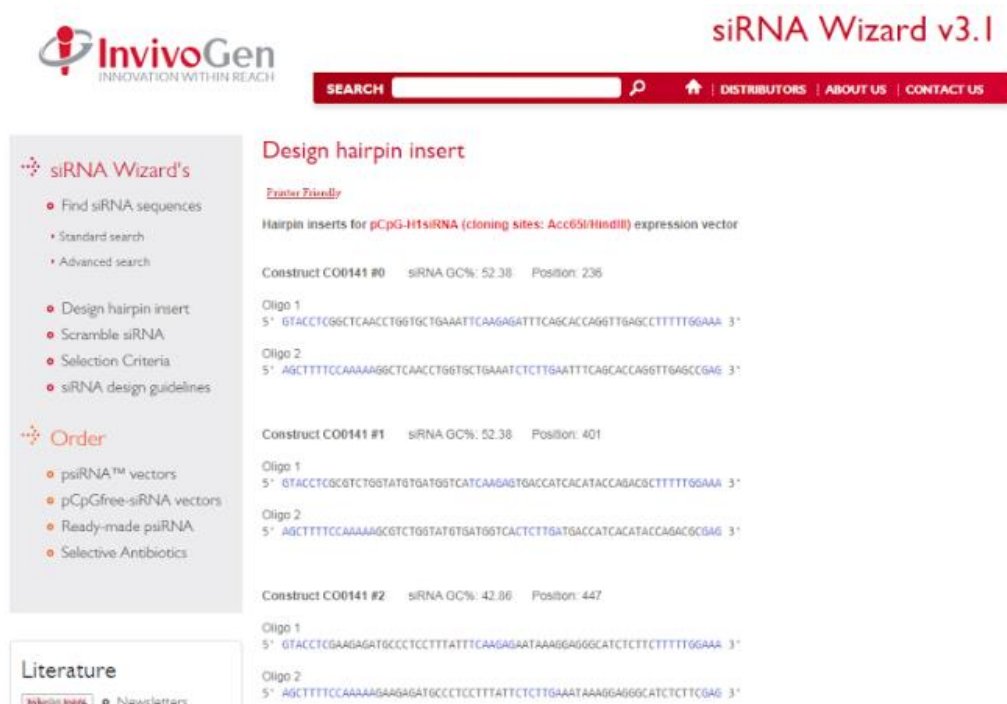
Not satisfied?
Try to change selection criteria in the Advanced section.

Meetings | Orders | Contact us | About us | Careers | Distributors

Figura 39. Instrucciones diseño de shARNs mediante herramientas bioinformáticas. Paso 2.

Finalmente, se seleccionan tantas cadenas como deseadas y el vector de clonación. En este proyecto se ha empleado el pCpG-H1siARN, cuyas encimas de clonación son ACC 651 y Hind III.

La pantalla final, donde se incluyen los datos de los oligos *forward* y *reverse*, es la siguiente:



siRNA Wizard v3.1

SEARCH

↑ DISTRIBUTORS ABOUT US CONTACT US

siRNA Wizard's

- Find siRNA sequences
 - Standard search
 - Advanced search
- Design hairpin insert
- Scramble siRNA
- Selection Criteria
- siRNA design guidelines

Order

- psiRNA™ vectors
- pCpGfree-siRNA vectors
- Ready-made psiRNA
- Selective Antibiotics

Literature

- Newsletters

Design hairpin insert

Fraser Friendly

Hairpin inserts for pCpG-H1siRNA (cloning sites: Acc65I/HindIII) expression vector

Construct CO0141 #0 siRNA GC%: 52.38 Position: 236

Oligo 1
5' GTACCTCGGCTCAACCTGGTGTGAAATTCAGAGATTTCAGACAGGTTGAGCCTTTTGGAAA 3'

Oligo 2
5' AGCTTTTCCAAAAGGCTCAACCTGGTGTGAAATCTCTTGAATTCAGACAGGTTGAGCCGAG 3'

Construct CO0141 #1 siRNA GC%: 52.38 Position: 401

Oligo 1
5' GTACCTCGGCTCTGTATGTATGTATCATCAGAGTGAACATCACATACAGACGCTTTTGGAAA 3'

Oligo 2
5' AGCTTTTCCAAAAGGCTCTGTATGTATGTATCACTCTTGTATGACCATCACATACAGACGCGAG 3'

Construct CO0141 #2 siRNA GC%: 42.86 Position: 447

Oligo 1
5' GTACCTCGAGAGATGCCCTCTTTATTTCAGAGAAATAGGAGGGCATCTCTCTTTTGGAAA 3'

Oligo 2
5' AGCTTTTCCAAAAGGAGAGATGCCCTCTTTATTCTCTTGAATTAAGGAGGGCATCTCTTCGAG 3'

Figura 40. Instrucciones diseño de shARNs mediante herramientas bioinformáticas. Paso 3.

7.3.2 Oligonucleótidos para amplificación

El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante la aplicación *Oligo Explorer*. El primer paso, como en el caso de los shARNs fue introducir la cadena a partir de la cual queremos diseñar estos oligonucleótidos (G6Pasa), tal y como se muestra en la **Figura** siguiente:

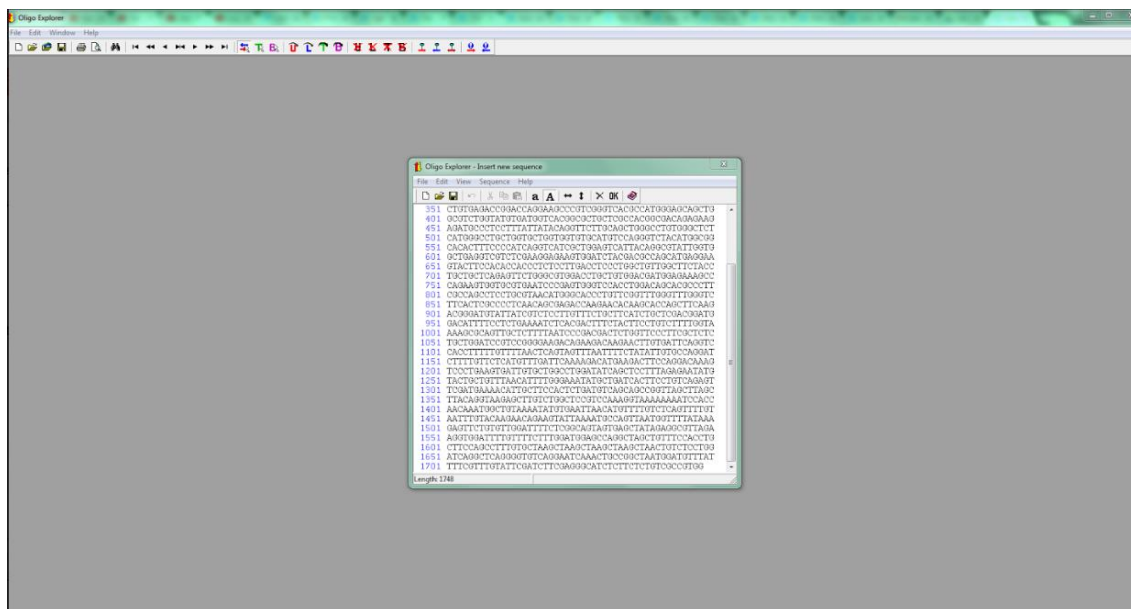
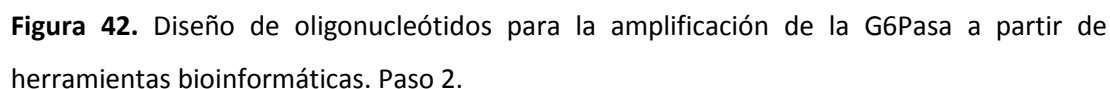


Figura 41. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la G6Pasa a partir de herramientas bioinformáticas. Paso 1.

El mismo programa presenta la imagen siguiente, donde el usuario debe seleccionar de que punto a que punto quiere diseñar el oligonucleótido. Para su diseño deben cumplirse las siguientes condiciones:

- Ni en la cadena *forward* ni en la cadena *reverse* deben aparecer *self annealing*. Es decir, no deben haber secciones de la cadena de que sean complementarios, creando en el mismo oligonucleótido una sección bicatenaria.
- Ni en la cadena *forward* ni en la cadena *reverse* deben aparecer *loopings*. Es decir, no deben haber cadenas complementarias específicas que hagan forma de horquilla en la cadena.
- La *temperatura de melting* (por acuerdo) debe ser de aproximadamente 65°C.
- La diferencia de temperaturas entre *forward* y *reverse* debe ser como máximo 1°C.
- El tamaño de la cadena debe ser de 20-30 pb.



Una vez cumplidas las premisas anteriores, se copia la secuencia y en la propia página de Sigma - Aldrich se introduce para diseñarla. Como se ha comentado anteriormente, ésta llega liofilizada y es necesario añadir cierta cantidad de agua (especificada por el fabricante) y, en el caso de este proyecto, alicuotarla en concentraciones de 10 mM.

NOTA: Mientras los oligonucleótidos para la amplificación de la G6Pasa se debe tomar toda la secuencia codificante, en el caso de los oligonucleótidos para la qPCR*screening* solo necesitan seleccionar una porción de 20-30 de la cds de la G6Pasa.

7.4 ANEXO 4: Secuenciación

Se recibe de Servicios Científicos de la UB el documento con la secuencia de los plásmidos enviada.

Una vez abierta, se revisa por encima que la secuenciación se ha llevado a cabo. Para ello, se debe observar un resultado similar al de la (si hay presencia de suciedad o el procedimiento de evaporación no se ha llevado correctamente, no hay puntas destacadas, sino que todo se detecta como “ruido”).

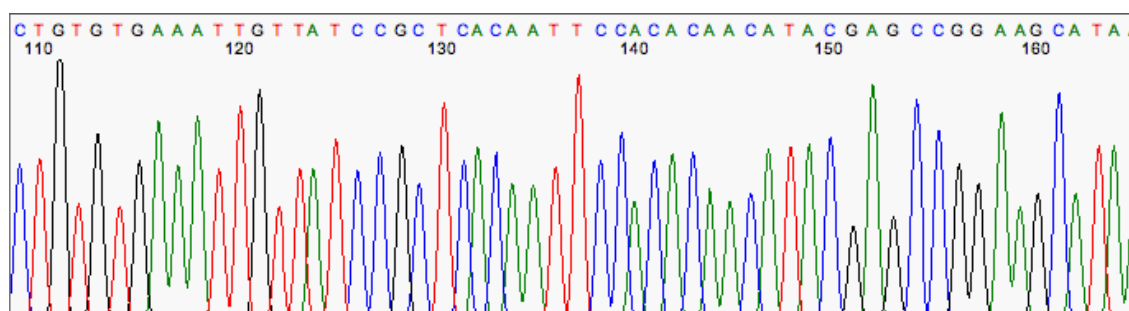


Figura 43. Ejemplo de secuenciación.

Seguidamente, se identifica la secuencia del oligonucleótido utilizado para la secuenciación. A partir de éste hacia delante, es donde se encuentra la secuencia de interés.

Una vez identificado, se copia en formato texto la secuencia y se compara con la del inserto. Por ejemplo, suponiendo que el objetivo es introducir el inserto Glucosa- 6 - Fosfatasa en el pcDNA₃, se compara la secuencia identificada Capítulo 7. Anexos (*Cadena completa de mARN Glucosa- 6 -Fosfatasa Sparus Aurata*). La comparación se hace mediante herramientas informáticas *online* como la aplicación *Allign*.

Se identifican mediante la comparación, aquellos puntos no coincidentes, y se revisan en el gráfico enviado si el pico erróneo podría simbolizar otra letra. Siguiendo estos pasos, se hacen las correcciones pertinentes.

Finalmente, si se identifica que alguna parte de la secuencia es errónea, se revisa si el cambio de nucleótido puede influir en el aminoácido complementario.

7.5 ANEXO 5: Resultados qPCR

Tabla 45. Resultados Ensayo 1. Amplificación con oligonucleótidos específicos de CMVB.

Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
Agua	CMVB	23,31	
Agua	CMVB	23,58	23,44
G6P.1	CMVB	20,47	
G6P.1	CMVB	20,48	20,47
G6P.2	CMVB	22,45	
G6P.2	CMVB	22,50	22,48
G6P.3	CMVB	21,84	
G6P.3	CMVB	21,75	21,79
No tratada 1	CMVB	21,56	
No tratada 1	CMVB	21,39	21,47
No tratada 2	CMVB	20,46	
No tratada 2	CMVB	20,43	20,45
No tratada 3	CMVB	19,97	
No tratada 3	CMVB	20,03	20,00
pcdna3.1	CMVB	20,22	
pcdna3.1	CMVB	19,77	20,00
pcdna3.2	CMVB	19,61	
pcdna3.2	CMVB	19,71	19,66
pcdna3.3	CMVB	22,02	
pcdna3.3	CMVB	22,21	22,11
sh1.1	CMVB	22,13	
sh1.1	CMVB	22,36	22,24
sh1.2	CMVB	21,51	
sh1.2	CMVB	21,72	21,61
sh1.3	CMVB	22,22	
sh1.3	CMVB	22,19	22,21
sh2.1	CMVB	21,58	
sh2.1	CMVB	21,71	21,65
sh2.2	CMVB	21,92	
sh2.2	CMVB	21,99	21,96
sh2.3	CMVB	21,97	
sh2.3	CMVB	21,87	21,92
sh3.1	CMVB	22,85	
sh3.1	CMVB	22,90	22,88
sh3.2	CMVB	21,51	
sh3.2	CMVB	21,44	21,47
sh3.3	CMVB	22,75	
sh3.3	CMVB	22,93	22,84
sh4.1	CMVB	20,92	
sh4.1	CMVB	20,67	20,80
sh4.2	CMVB	21,88	
sh4.2	CMVB	21,96	21,92
sh4.3	CMVB	20,95	
sh4.3	CMVB	20,94	20,94

Tabla 46. Resultados Ensayo 1. Amplificación con oligonucleótidos específicos de HPRT.

Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
Agua	HPRT	29,80	
Agua	HPRT	29,94	29,87
G6P1	HPRT	19,98	
G6P1	HPRT	21,33	20,66
G6P2	HPRT	23,12	
G6P2	HPRT	23,42	23,27
G6P3	HPRT	22,71	
G6P3	HPRT	22,63	22,67
NT1	HPRT	25,39	
NT1	HPRT	25,42	25,40
NT2	HPRT	24,80	
NT2	HPRT	24,66	24,73
NT3	HPRT	25,50	
NT3	HPRT	25,30	25,40
pcADN3-1	HPRT	21,15	
pcADN3-1	HPRT	21,62	21,38
pcADN3-2	HPRT	20,33	
pcADN3-2	HPRT	20,26	20,29
pcADN3-3	HPRT	21,96	
pcADN3-3	HPRT	21,49	21,73
sh1-1	HPRT	21,99	
sh1-1	HPRT	23,70	22,85
sh1-2	HPRT	22,15	
sh1-2	HPRT	22,33	22,24
sh1-3	HPRT	22,62	
sh1-3	HPRT	22,55	22,58
sh2-1	HPRT	21,91	
sh2-1	HPRT	22,15	22,03
sh2-2	HPRT	22,22	
sh2-2	HPRT	22,77	22,50
sh2-3	HPRT	23,03	
sh2-3	HPRT	22,98	23,00
sh3-1	HPRT	24,24	
sh3-1	HPRT	24,11	24,18
sh3-2	HPRT	23,41	
sh3-2	HPRT	23,25	23,33
sh3-3	HPRT	23,00	
sh3-3	HPRT	22,84	22,92
sh4-1	HPRT	21,51	
sh4-1	HPRT	21,54	21,52
sh4-2	HPRT	21,42	
sh4-2	HPRT	21,74	21,58
sh4-3	HPRT	20,99	
sh4-3	HPRT	21,48	21,24

Tabla 47. Promedio geométrico de los CT de HPRT y CMVB y resultados de la amplificación de la G6Pasa con sus oligonucleótidos específicos.

Promedio geo.	Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
26,46	Agua	G6pasa	23,89	23,91
	Agua	G6pasa	23,92	
20,57	pcDNA3 ·G6P1	G6pasa	18,12	18,16
	pcDNA3 ·G6P1	G6pasa	18,21	
22,87	pcDNA3 ·G6P2	G6pasa	20,54	20,69
	pcDNA3 ·G6P2	G6pasa	20,85	
22,23	pcDNA3 ·G6P3	G6pasa	19,20	19,09
	pcDNA3 ·G6P3	G6pasa	18,98	
23,36	NT1	G6pasa	23,48	23,43
	NT1	G6pasa	23,37	
22,49	NT2	G6pasa	23,69	23,77
	NT2	G6pasa	23,85	
22,54	NT3	G6pasa	23,30	23,55
	NT3	G6pasa	23,80	
20,68	pcADN ₃ -1	G6pasa	17,02	17,21
	pcADN ₃ -1	G6pasa	17,39	
19,97	pcADN ₃ -2	G6pasa	23,18	23,23
	pcADN ₃ -2	G6pasa	23,29	
21,92	pcADN ₃ -3	G6pasa	23,39	23,17
	pcADN ₃ -3	G6pasa	22,95	
22,54	pCpG-sh1-1	G6pasa	21,76	21,83
	pCpG-sh1-1	G6pasa	21,90	
21,92	pCpG-sh1-2	G6pasa	20,87	20,88
	pCpG-sh1-2	G6pasa	20,89	
22,40	pCpG-sh1-3	G6pasa	22,08	22,09
	pCpG-sh1-3	G6pasa	22,10	
21,84	pCpG-sh2-1	G6pasa	20,45	20,48
	pCpG-sh2-1	G6pasa	20,50	
22,23	pCpG-sh2-2	G6pasa	20,50	20,68
	pCpG-sh2-2	G6pasa	20,86	
22,46	pCpG-sh2-3	G6pasa	20,72	20,81
	pCpG-sh2-3	G6pasa	20,91	
23,52	pCpG-sh3-1	G6pasa	21,43	21,44
	pCpG-sh3-1	G6pasa	21,46	
22,38	pCpG-sh3-2	G6pasa	20,70	20,72
	pCpG-sh3-2	G6pasa	20,74	
22,88	pCpG-sh3-3	G6pasa	21,64	21,76
	pCpG-sh3-3	G6pasa	21,88	
21,16	pCpG-sh4-1	G6pasa	14,55	14,75
	pCpG-sh4-1	G6pasa	14,94	
21,75	pCpG-sh4-2	G6pasa	22,05	22,27
	pCpG-sh4-2	G6pasa	22,48	
21,09	pCpG-sh4-3	G6pasa	20,49	20,52
	pCpG-sh4-3	G6pasa	20,56	

Tabla 48. Normalización de los valores de la amplificación de la G6Pasa.

	CT G6Pasa	Normalizado	-ΔΔCT	PROMEDIOS		DESV. ESTANDAR
pcDNA3 ·G6P1	18,12	0,00	1,00	0,97	0,55	0,40
pcDNA3 ·G6P1	18,21	0,09	0,94			
pcDNA3 ·G6P2	20,54	2,42	0,19	0,17		
pcDNA3 ·G6P2	20,85	2,73	0,15			
pcDNA3 ·G6P3	19,20	1,08	0,47	0,51		
pcDNA3 ·G6P3	18,98	0,86	0,55			
NT1	23,48	5,37	0,02	0,03	0,02	0,00
NT1	23,37	5,25	0,03			
NT2	23,69	5,58	0,02	0,02		
NT2	23,85	5,74	0,02			
NT3	23,30	5,18	0,03	0,02		
NT3	23,80	5,69	0,02			
pcADN ₃ -1	17,02	-1,09	2,13	1,89	0,65	1,08
pcADN ₃ -1	17,39	-0,73	1,65			
pcADN ₃ -2	23,18	5,07	0,03	0,03		
pcADN ₃ -2	23,29	5,17	0,03			
pcADN ₃ -3	23,39	5,28	0,03	0,03		
pcADN ₃ -3	22,95	4,83	0,04			
pCpG·sh1-1	21,76	3,64	0,08	0,08	0,10	0,05
pCpG·sh1-1	21,90	3,78	0,07			
pCpG·sh1-2	20,87	2,75	0,15	0,15		
pCpG·sh1-2	20,89	2,77	0,15			
pCpG·sh1-3	22,08	3,97	0,06	0,06		
pCpG·sh1-3	22,10	3,98	0,06			
pCpG·sh2-1	20,45	2,33	0,20	0,19	0,17	0,02
pCpG·sh2-1	20,50	2,39	0,19			
pCpG·sh2-2	20,50	2,38	0,19	0,17		
pCpG·sh2-2	20,86	2,74	0,15			
pCpG·sh2-3	20,72	2,60	0,17	0,15		
pCpG·sh2-3	20,91	2,79	0,14			
pCpG·sh3-1	21,43	3,31	0,10	0,10	0,11	0,04
pCpG·sh3-1	21,46	3,34	0,10			
pCpG·sh3-2	20,70	2,58	0,17	0,16		
pCpG·sh3-2	20,74	2,62	0,16			
pCpG·sh3-3	21,64	3,52	0,09	0,08		
pCpG·sh3-3	21,88	3,76	0,07			
pCpG·sh4-1	14,55	-3,57	11,84	10,43	0,12	0,09
pCpG·sh4-1	14,94	-3,17	9,03			
pCpG·sh4-2	22,05	3,93	0,07	0,06		
pCpG·sh4-2	22,48	4,37	0,05			
pCpG·sh4-3	20,49	2,37	0,19	0,19		
pCpG·sh4-3	20,56	2,44	0,18			

Tabla 49. Normalización total de la amplificación de la G6Pasa.

	Dif HPRT y CMVB	Normalizado	- $\Delta\Delta CT$	PROMEDIOS	DESV. ESTANDAR
pcADN3-G6Pasa	-2,45	0,00	1,00	0,97	1,14 0,42
	-2,36	0,09	0,94		
	-2,33	0,12	0,92	0,83	
	-2,02	0,43	0,74		
	-3,03	-0,58	1,50	1,62	
	-3,25	-0,80	1,74		
No tratada	0,13	2,58	0,17	0,17	0,17 0,07
	0,01	2,46	0,18		
	1,21	3,66	0,08	0,08	
	1,37	3,82	0,07		
	0,76	3,21	0,11	0,09	
	1,26	3,71	0,08		
pcADN3	-3,65	-1,21	2,31	2,05	0,05 0,04
	-3,29	-0,84	1,79		
	3,21	5,66	0,02	0,02	
	3,31	5,76	0,02		
	1,48	3,93	0,07	0,08	
	1,03	3,48	0,09		
pCpG-shARN1	-0,78	1,67	0,32	0,30	0,30 0,08
	-0,65	1,80	0,29		
	-1,05	1,39	0,38	0,38	
	-1,03	1,41	0,38		
	-0,31	2,13	0,23	0,23	
	-0,30	2,15	0,23		
pCpG-shARN12	-1,39	1,06	0,48	0,47	0,53 0,05
	-1,33	1,11	0,46		
	-1,73	0,72	0,61	0,54	
	-1,37	1,08	0,47		
	-1,74	0,71	0,61	0,57	
	-1,55	0,90	0,54		
pCpG-shARN13	-2,09	0,36	0,78	0,77	0,58 0,19
	-2,06	0,39	0,76		
	-1,68	0,77	0,59	0,58	
	-1,64	0,81	0,57		
	-1,24	1,21	0,43	0,40	
	-1,00	1,45	0,37		
pCpG-shARN14	-6,61	-4,16	17,85	15,74	0,20 0,10
	-6,22	-3,77	13,62		
	0,30	2,75	0,15	0,13	
	0,73	3,18	0,11		
	-0,60	1,85	0,28	0,27	
	-0,53	1,92	0,26		

Ensayo 2

Tabla 50. Resultados Ensayo 2. Amplificación con oligonucleótidos específicos de CMVB.

Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
Agua	CMVB	26,99	
Agua	CMVB	27,18	27,09
PCADN3-G6Pasa 1	CMVB	20,71	
PCADN3-G6Pasa1	CMVB	20,64	20,67
PCADN3-G6Pasa2	CMVB	22,09	
PCADN3-G6Pasa2	CMVB	21,96	22,03
PCADN3-G6Pasa3	CMVB	22,04	
PCADN3-G6Pasa3	CMVB	21,98	22,01
No Tratada 1	CMVB	19,46	
No Tratada 1	CMVB	18,60	19,03
No Tratada 2	CMVB	20,35	
No Tratada 2	CMVB	19,83	20,09
No Tratada 3	CMVB	20,41	
No Tratada 3	CMVB	20,48	20,44
pcADN3-1	CMVB	20,10	
pcADN3-1	CMVB	20,43	20,26
pcADN3-2	CMVB	20,11	
pcADN3-2	CMVB	20,30	20,20
pcADN3-3	CMVB	20,21	
pcADN3-3	CMVB	20,31	20,26
pCpG-shARN1-1	CMVB	20,96	
pCpG-shARN1-1	CMVB	20,99	20,98
pCpG-shARN1-2	CMVB	21,50	
pCpG-shARN1-2	CMVB	20,72	21,11
pCpG-shARN1-3	CMVB	21,57	
pCpG-shARN1-3	CMVB	21,96	21,76
pCpG-shARN2-1	CMVB	23,06	
pCpG-shARN2-1	CMVB	23,38	23,22
pCpG-shARN2-2	CMVB	21,43	
pCpG-shARN2-2	CMVB	23,01	22,22
pCpG-shARN2-3	CMVB	23,95	
pCpG-shARN2-3	CMVB	23,91	23,93
pCpG-shARN2-1	CMVB	23,11	
pCpG-shARN3-1	CMVB	23,14	23,13
pCpG-shARN3-2	CMVB	20,58	
pCpG-shARN3-2	CMVB	20,86	20,72
pCpG-shARN3-3	CMVB	21,09	
pCpG-shARN3-3	CMVB	20,98	21,04
pCpG-shARN4-1	CMVB	21,38	
pCpG-shARN4-1	CMVB	21,41	21,39
pCpG-shARN4-2	CMVB	25,27	
pCpG-shARN4-2	CMVB	25,02	25,15
pCpG-shARN4-3	CMVB	19,95	
pCpG-shARN4-3	CMVB	20,08	20,02

Tabla 51. Resultados Ensayo 2. Amplificación con oligonucleótidos específicos de HPRT.

Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
Agua	HPRT	29,85	
Agua	HPRT	28,28	29,07
PCADN3-G6Pasa 1	HPRT	20,70	
PCADN3-G6Pasa1	HPRT	20,83	20,77
PCADN3-G6Pasa2	HPRT	20,99	
PCADN3-G6Pasa2	HPRT	21,17	21,08
PCADN3-G6Pasa3	HPRT	21,93	
PCADN3-G6Pasa3	HPRT	21,98	21,96
No Tratada 1	HPRT	19,26	
No Tratada 1	HPRT	19,57	19,41
No Tratada 2	HPRT	19,63	
No Tratada 2	HPRT	20,54	20,09
No Tratada 3	HPRT	21,69	
No Tratada 3	HPRT	19,01	20,35
pcADN3-1	HPRT	20,92	
pcADN3-1	HPRT	20,60	20,76
pcADN3-2	HPRT	20,64	
pcADN3-2	HPRT	20,53	20,58
pcADN3-3	HPRT	20,69	
pcADN3-3	HPRT	19,98	20,34
pCpG-shARN1-1	HPRT	19,07	
pCpG-shARN1-1	HPRT	20,01	19,54
pCpG-shARN1-2	HPRT	19,20	
pCpG-shARN1-2	HPRT	20,09	19,65
pCpG-shARN1-3	HPRT	21,56	
pCpG-shARN1-3	HPRT	21,47	21,51
pCpG-shARN2-1	HPRT	21,27	
pCpG-shARN2-1	HPRT	20,98	21,13
pCpG-shARN2-2	HPRT	20,27	
pCpG-shARN2-2	HPRT	20,26	20,26
pCpG-shARN2-3	HPRT	20,99	
pCpG-shARN2-3	HPRT	21,01	21,00
pCpG-shARN2-1	HPRT	22,15	
pCpG-shARN3-1	HPRT	22,01	22,08
pCpG-shARN3-2	HPRT	20,17	
pCpG-shARN3-2	HPRT	19,85	20,01
pCpG-shARN3-3	HPRT	20,98	
pCpG-shARN3-3	HPRT	20,95	20,96
pCpG-shARN4-1	HPRT	20,03	
pCpG-shARN4-1	HPRT	19,96	20,00
pCpG-shARN4-2	HPRT	27,93	
pCpG-shARN4-2	HPRT	27,62	27,77
pCpG-shARN4-3	HPRT	19,92	
pCpG-shARN4-3	HPRT	19,53	19,73

Tabla 52. Promedio geométrico de los CT de HPRT y CMVB y resultados de la amplificación de la G6Pasa con sus oligonucleótidos específicos.

Promedio geo.	Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
28,06	Agua	G6pasa	25,87	25,90
	Agua	G6pasa	25,93	
20,72	PCADN3·G6Pasa 1	G6pasa	17,29	17,30
	PCADN3·G6Pasa1	G6pasa	17,30	
21,55	PCADN3·G6Pasa2	G6pasa	17,82	17,80
	PCADN3·G6Pasa2	G6pasa	17,77	
21,98	PCADN3·G6Pasa3	G6pasa	18,21	18,31
	PCADN3·G6Pasa3	G6pasa	18,41	
19,22	No Tratada 1	G6pasa	23,61	23,50
	No Tratada 1	G6pasa	23,39	
20,09	No Tratada 2	G6pasa	25,20	23,99
	No Tratada 2	G6pasa	22,78	
20,40	No Tratada 3	G6pasa	24,83	24,78
	No Tratada 3	G6pasa	24,73	
20,51	pcADN3-1	G6pasa	25,47	25,44
	pcADN3-1	G6pasa	25,40	
20,39	pcADN3-2	G6pasa	24,97	25,11
	pcADN3-2	G6pasa	25,26	
20,30	pcADN3-3	G6pasa	25,46	25,49
	pcADN3-3	G6pasa	25,53	
20,25	pCpG·shARN1-1	G6pasa	20,46	20,64
	pCpG·shARN1-1	G6pasa	20,82	
20,37	pCpG·shARN1-2	G6pasa	21,68	20,84
	pCpG·shARN1-2	G6pasa	20,01	
21,64	pCpG·shARN1-3	G6pasa	21,45	21,21
	pCpG·shARN1-3	G6pasa	20,96	
22,15	pCpG·shARN2-1	G6pasa	21,94	21,95
	pCpG·shARN2-1	G6pasa	21,96	
21,22	pCpG·shARN2-2	G6pasa	20,99	20,80
	pCpG·shARN2-2	G6pasa	20,60	
22,42	pCpG·shARN2-3	G6pasa	23,08	23,23
	pCpG·shARN2-3	G6pasa	23,38	
22,60	pCpG·shARN2-1	G6pasa	21,83	21,47
	pCpG·shARN3-1	G6pasa	21,11	
20,36	pCpG·shARN3-2	G6pasa	19,51	19,16
	pCpG·shARN3-2	G6pasa	18,80	
21,00	pCpG·shARN3-3	G6pasa	19,28	19,49
	pCpG·shARN3-3	G6pasa	19,69	
20,68	pCpG·shARN4-1	G6pasa	20,85	21,03
	pCpG·shARN4-1	G6pasa	21,21	
26,43	pCpG·shARN4-2	G6pasa	25,43	25,37
	pCpG·shARN4-2	G6pasa	25,31	
19,87	pCpG·shARN4-3	G6pasa	20,49	20,52
	pCpG·shARN4-3	G6pasa	20,55	

Tabla 53. Normalización de los valores de la amplificación de la G6Pasa.

Sample Name	CT G6Pasa	Normalizado	- $\Delta\Delta CT$	PROMEDIOS		DESV. ESTANDAR
PCADN3-G6Pasa 1	17,29	0,00	1,00	0,99	0,73	0,25
PCADN3-G6Pasa1	17,30	0,02	0,99			
PCADN3-G6Pasa2	17,82	0,54	0,69	0,70		
PCADN3-G6Pasa2	17,77	0,48	0,71			
PCADN3-G6Pasa3	18,21	0,92	0,53	0,49		
PCADN3-G6Pasa3	18,41	1,12	0,46			
No Tratada 1	23,61	6,33	0,01	0,01	0,01	0,00
No Tratada 1	23,39	6,10	0,01			
No Tratada 2	25,20	7,91	0,00	0,01		
No Tratada 2	22,78	5,49	0,02			
No Tratada 3	24,83	7,55	0,01	0,01		
No Tratada 3	24,73	7,44	0,01			
pcADN3-1	25,47	8,18	0,00	0,00	0,00	0,00
pcADN3-1	25,40	8,12	0,00			
pcADN3-2	24,97	7,69	0,00	0,00		
pcADN3-2	25,26	7,97	0,00			
pcADN3-3	25,46	8,17	0,00	0,00		
pcADN3-3	25,53	8,24	0,00			
pCpG-shARN1-1	20,46	3,18	0,11	0,10	0,09	0,02
pCpG-shARN1-1	20,82	3,54	0,09			
pCpG-shARN1-2	21,68	4,39	0,05	0,10		
pCpG-shARN1-2	20,01	2,73	0,15			
pCpG-shARN1-3	21,45	4,17	0,06	0,07		
pCpG-shARN1-3	20,96	3,67	0,08			
pCpG-shARN2-1	21,94	4,65	0,04	0,04	0,05	0,04
pCpG-shARN2-1	21,96	4,67	0,04			
pCpG-shARN2-2	20,99	3,70	0,08	0,09		
pCpG-shARN2-2	20,60	3,32	0,10			
pCpG-shARN2-3	23,08	5,80	0,02	0,02		
pCpG-shARN2-3	23,38	6,09	0,01			
pCpG-shARN2-1	21,83	4,54	0,04	0,06	0,19	0,12
pCpG-shARN3-1	21,11	3,83	0,07			
pCpG-shARN3-2	19,51	2,22	0,21	0,28		
pCpG-shARN3-2	18,80	1,52	0,35			
pCpG-shARN3-3	19,28	1,99	0,25	0,22		
pCpG-shARN3-3	19,69	2,41	0,19			
pCpG-shARN4-1	20,85	3,57	0,08	0,08	0,05	0,05
pCpG-shARN4-1	21,21	3,93	0,07			
pCpG-shARN4-2	25,43	8,14	0,00	0,00		
pCpG-shARN4-2	25,31	8,03	0,00			
pCpG-shARN4-3	20,49	3,21	0,11	0,11		
pCpG-shARN4-3	20,55	3,27	0,10			

Tabla 54. Normalización total de la amplificación de la G6Pasa.

	Dif HPRT/CMVB	Normalizado	-ΔΔCT	PROMEDIOS		DESV. ESTANDAR	
Agua	-30,26	1,00 0,00	0,50 1,00		0,87 0,35		
pcADN3·G6P	-3,43	0,00	1,00	0,99	1,14 0,13		
	-3,42	0,02	0,99				
	-3,72	-0,29	1,22	1,24			
	-3,77	-0,34	1,27				
	-3,77	-0,34	1,26	1,18			
	-3,58	-0,14	1,10				
No tratada	4,39	7,83	0,00	0,00	0,00 0,00		
	4,17	7,60	0,01				
	5,11	8,54	0,00	0,01			
	2,69	6,12	0,01				
	4,44	7,87	0,00	0,00			
	4,33	7,76	0,00				
pcADN3	4,96	8,39	0,00	0,00	0,00 0,00		
	4,89	8,33	0,00				
	4,58	8,02	0,00	0,00			
	4,87	8,30	0,00				
	5,16	8,59	0,00	0,00			
	5,23	8,66	0,00				
pCpG·shARN 1	0,22	3,65	0,08	0,07	0,09 0,03		
	0,58	4,01	0,06				
	1,31	4,74	0,04	0,08			
	-0,35	3,08	0,12				
	-0,18	3,25	0,11	0,13			
	-0,68	2,76	0,15				
pCpG·shARN 2	-0,21	3,22	0,11	0,11	0,09 0,04		
	-0,19	3,24	0,11				
	-0,23	3,20	0,11	0,13			
	-0,62	2,82	0,14				
	0,67	4,10	0,06	0,05			
	0,96	4,39	0,05				
pCpG·shARN 3	-0,77	2,66	0,16	0,21	0,23 0,03		
	-1,48	1,95	0,26				
	-0,86	2,58	0,17	0,22			
	-1,56	1,87	0,27				
	-1,72	1,71	0,30	0,27			
	-1,30	2,13	0,23				
pCpG·shARN 4	0,17	3,60	0,08	0,07	0,11 0,07		
	0,53	3,96	0,06				
	-1,00	2,43	0,18	0,19			
	-1,11	2,32	0,20				
	0,62	4,06	0,06	0,06			
	0,68	4,12	0,06				

Ensayo 3

Tabla 55. Resultados Ensayo 3. Amplificación con oligonucleótidos específicos de CMVB.

Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
Agua	CMVB	29,20	29,17
Agua	CMVB	29,13	
No tratada 1	CMVB	20,29	20,63
No tratada 1	CMVB	20,98	
No tratada 2	CMVB	20,80	20,21
No tratada 2	CMVB	19,63	
No tratada 3	CMVB	22,55	22,39
No tratada 3	CMVB	22,22	
pCpG-shARN1.1.1	CMVB	19,95	20,47
pCpG-shARN1.1.1	CMVB	21,00	
pCpG-shARN1.1.2	CMVB	22,14	22,16
pCpG-shARN1.1.2	CMVB	22,18	
pCpG-shARN1.1.3	CMVB	21,62	21,54
pCpG-shARN1.1.3	CMVB	21,47	
pCpG-shARN1.2.1	CMVB	21,22	21,16
pCpG-shARN1.2.1	CMVB	21,09	
pCpG-shARN1.2.2	CMVB	19,73	19,82
pCpG-shARN1.2.2.	CMVB	19,91	
pCpG-shARN1.2.3	CMVB	21,22	21,09
pCpG-shARN1.2.3	CMVB	20,96	
pCpG-shARN1.3.1	CMVB	20,42	20,59
pCpG-shARN1.3.1	CMVB	20,76	
pCpG-shARN1.3.2	CMVB	20,84	20,96
pCpG-shARN1.3.2	CMVB	21,09	
pCpG-shARN1.3.3	CMVB	21,63	21,63
pCpG-shARN1.3.3	CMVB	21,62	
pCpG-shARN1.4.1	CMVB	19,17	19,21
pCpG-shARN1.4.1	CMVB	19,25	
pCpG-shARN 1.4.2	CMVB	21,65	21,97
pCpG-shARN1.4.2	CMVB	22,29	
pCpG-shARN1.4.3	CMVB	21,81	21,72
pCpG-shARN1.4.3	CMVB	21,63	
pCpG-shARN1.5.1	CMVB	19,15	19,50
pCpG-shARN1.5.1	CMVB	19,84	
pCpG-shARN1.5.2	CMVB	20,60	20,76
pCpG-shARN1.5.2	CMVB	20,92	
pCpG-shARN1.5.3	CMVB	21,43	21,58
pCpG-shARN1.5.3	CMVB	21,73	
pcADN3G6P1	CMVB	22,36	22,50
pcADN3G6P1	CMVB	22,64	

Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
pcADN3G6P2	CMVB	20,47	20,46
pcADN3G6P2	CMVB	20,44	
pcADN3G6P3	CMVB	21,45	21,44
pcADN3G6P3	CMVB	21,42	

Tabla 56. Resultados Ensayo 1. Amplificación con oligonucleótidos específicos de HPRT.

Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
Agua	HPRT	30,49	30,74
Agua	HPRT	30,99	
No tratada 1	HPRT	23,72	23,43
No tratada 1	HPRT	23,13	
No tratada 2	HPRT	21,62	22,24
No tratada 2	HPRT	22,86	
No tratada 3	HPRT	24,68	25,44
No tratada 3	HPRT	26,20	
sh1.1.1	HPRT	21,36	23,11
sh1.1.1	HPRT	24,87	
sh1.1.2	HPRT	24,50	24,02
sh1.1.2	HPRT	23,55	
sh1.1.3	HPRT	22,15	22,59
sh1.1.3	HPRT	23,03	
sh1.2.1	HPRT	21,61	22,32
sh1.2.1	HPRT	23,03	
sh1.2.2	HPRT	23,36	22,64
sh1.2.2.	HPRT	21,92	
sh1.2.3	HPRT	21,44	22,18
sh1.2.3	HPRT	22,93	
sh1.3.1	HPRT	22,61	23,00
sh1.3.1	HPRT	23,39	
sh1.3.2	HPRT	23,05	22,83
sh1.3.2	HPRT	22,61	
sh1.3.3	HPRT	21,42	22,13
sh1.3.3	HPRT	22,84	
sh1.4.1	HPRT	20,81	21,60
ah1.4.1	HPRT	22,38	
sh1.4.2	HPRT	22,38	21,93
sh1.4.2	HPRT	21,48	
sh1.4.3	HPRT	22,64	22,33
sh1.4.3	HPRT	22,02	
sh1.5.1	HPRT	21,38	21,63
sh1.5.1	HPRT	21,88	
sh1.5.2	HPRT	20,67	20,99
sh1.5.2	HPRT	21,31	

Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
sh1.5.3	HPRT	22,14	21,95
sh1.5.3	HPRT	21,76	
pcADN3G6P1	HPRT	21,36	
pcADN3G6P1	HPRT	21,88	21,62
pcADN3G6P2	HPRT	21,09	
pcADN3G6P2	HPRT	22,88	21,98
pcADN3G6P3	HPRT	24,06	
pcADN3G6P3	HPRT	22,37	23,22

Tabla 57. Promedio geométrico de los CT de HPRT y CMVB y resultados de la amplificación de la G6Pasa con sus oligonucleótidos específicos.

Promedio geo.	Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
29,9448602	Agua	G6P	25,88	25,89
	Agua	G6P	25,91	
21,98679905	No tratada 1	G6P	25,55	25,46
	No tratada 1	G6P	25,37	
21,20188615	No tratada 2	G6P	25,82	25,95
	No tratada 2	G6P	26,07	
23,86533958	No tratada 3	G6P	25,37	25,35
	No tratada 3	G6P	25,33	
21,75422256	sh1.1.1	G6P	14,46	14,66
	sh1.1.1	G6P	14,85	
23,0732779	sh1.1.2	G6P	18,84	18,40
	sh1.1.2	G6P	17,96	
22,06092583	sh1.1.3	G6P	15,61	15,64
	sh1.1.3	G6P	15,67	
21,73000985	sh1.2.1	G6P	15,96	15,98
	sh1.2.1	G6P	16,00	
21,18293795	sh1.2.2	G6P	17,14	16,96
	sh1.2.2.	G6P	16,78	
21,62834736	sh1.2.3	G6P	14,93	15,18
	sh1.2.3	G6P	15,43	
21,76255845	sh1.3.1	G6P	18,14	17,91
	sh1.3.1	G6P	17,68	
21,87724273	sh1.3.2	G6P	17,95	17,88
	sh1.3.2	G6P	17,80	
21,87684966	sh1.3.3	G6P	17,39	17,18
	sh1.3.3	G6P	16,97	
20,36683672	sh1.4.1	G6P	17,79	17,39
	ah1.4.1	G6P	16,99	
21,94927404	sh1.4.2	G6P	18,35	18,10
	sh1.4.2	G6P	17,86	

Promedio geo.	Sample Name	Target Name	CT	Promedio CT
22,02552561	sh1.4.3	G6P	18,17	18,17
	sh1.4.3	G6P	18,16	
20,53574584	sh1.5.1	G6P	17,16	17,18
	sh1.5.1	G6P	17,19	
20,87558263	sh1.5.2	G6P	17,13	17,13
	sh1.5.2	G6P	17,13	
21,7632656	sh1.5.3	G6P	18,44	18,61
	sh1.5.3	G6P	18,78	
22,05603431	pcADN3G6P1	G6P	15,91	15,96
	pcADN3G6P1	G6P	16,00	
21,20527	pcADN3G6P2	G6P	15,74	15,75
	pcADN3G6P2	G6P	15,75	
22,30858985	pcADN3G6P3	G6P	16,52	16,89
	pcADN3G6P3	G6P	17,26	

Tabla 58. Normalización de los valores de la amplificación de la G6Pasa.

	CT G6Pasa	Normalizado	- $\Delta\Delta CT$	PROMEDIOS		DESV. ESTANDAR
No tratada 1	25,55	0,00	1,00	1,07	0,99	0,20
No tratada 1	25,37	-0,18	1,13			
No tratada 2	25,82	0,27	0,83	0,76		
No tratada 2	26,07	0,52	0,70			
No tratada 3	25,37	-0,18	1,13	1,15		
No tratada 3	25,33	-0,22	1,16			
sh1.1.1	14,46	-11,09	2176,70	2176,70	1103,49	1018,98
sh1.1.1	14,85	-10,70				
sh1.1.2	18,84	-6,72	105,18	149,16		
sh1.1.2	17,96	-7,59	193,14			
sh1.1.3	15,61	-9,94	984,61	984,61		
sh1.1.3	15,67	-9,88				
sh1.2.1	15,96	-9,59	771,03	759,74	830,89	481,80
sh1.2.1	16,00	-9,55	748,46			
sh1.2.2	17,14	-8,41	341,19	388,62		
sh1.2.2.	16,78	-8,77	436,04			
sh1.2.3	14,93	-10,62	1572,58	1344,30		
sh1.2.3	15,43	-10,12	1116,02			
sh1.3.1	18,14	-7,42	170,71	202,71	247,59	76,01
sh1.3.1	17,68	-7,87	234,71			
sh1.3.2	17,95	-7,60	194,16	204,70		
sh1.3.2	17,80	-7,75	215,23			
sh1.3.3	17,39	-8,16	286,96	335,35		
sh1.3.3	16,97	-8,58	383,75			

Sample Name	CT G6Pasa	Normalizado	-ΔΔCT	PROMEDIOS		DESV. ESTANDAR
sh1.4.1	17,79	-7,76	217,36	297,73	214,04	72,64
ah1.4.1	16,99	-8,56	378,09			
sh1.4.2	18,35	-7,20	147,33	177,15		
sh1.4.2	17,86	-7,69	206,97	167,25		
sh1.4.3	18,17	-7,38	166,60			
sh1.4.3	18,16	-7,39	167,89			
sh1.5.1	17,16	-8,39	335,33	332,23	266,28	123,53
sh1.5.1	17,19	-8,36	329,14			
sh1.5.2	17,13	-8,42	342,24	342,83		
sh1.5.2	17,13	-8,42	343,42			
sh1.5.3	18,44	-7,11	138,18	123,77		
sh1.5.3	18,78	-6,77	109,37			
pcADN3G6P1	15,91	-9,64	796,80	773,41	695,83	247,80
pcADN3G6P1	16,00	-9,55	750,02			
pcADN3G6P2	15,74	-9,82	901,54	895,56		
pcADN3G6P2	15,75	-9,80	889,57			
pcADN3G6P3	16,52	-9,03	523,47	418,53		
pcADN3G6P3	17,26	-8,29	313,59			

Tabla 59. Normalización total de la amplificación de la G6Pasa.

	Dif HPRT	Normalizado	-ΔΔCT	PROMEDIOS		DESV. ESTANDAR
Agua	-34,02	1,00	0,50		0,91	0,35
		0,00	1,00			
No tratada	3,57	0,00	1,00	1,07		
	3,39	-0,18	1,13			
	4,62	1,05	0,48	0,44	1,91	2,03
	4,87	1,31	0,40			
	1,50	-2,06	4,17	4,22		
	1,47	-2,10	4,27			
sh1.1	-7,29	-10,86		1416,37		
	-6,90	-10,47	1416,37			
	-4,24	-7,80		410,15	946,75	506,44
	-5,11	-8,68	410,15			
	-6,45	-10,02	1036,52	1013,72		
	-6,39	-9,95	990,92			
sh1.2	-5,77	-9,33	645,31	635,87		
	-5,73	-9,29	626,42			
	-4,05	-7,61		249,77	585,38	313,43
	-4,40	-7,96	249,77			
	-6,70	-10,26		870,50		
	-6,20	-9,77	870,50			

	Dif HPRT	Normalizado	-ΔΔCT	PROMEDIOS		DESV. ESTANDAR
sh1.3	-3,63	-7,19	146,14	173,53	224,67	74,98
	-4,09	-7,65	200,93			
	-3,93	-7,49	179,97	189,73		
	-4,08	-7,64	199,49			
	-4,49	-8,05	265,90	310,74		
	-4,91	-8,47	355,59			
sh1.4	-2,58	-6,14	70,72	96,86	147,09	43,50
	-3,38	-6,94	123,01			
	-3,60	-7,17	143,55	172,60		
	-4,09	-7,66	201,66			
	-3,85	-7,42	171,13	171,80		
	-3,87	-7,43	172,46			
sh1.5	-3,37	-6,94	122,65	121,52	128,74	27,08
	-3,35	-6,91	120,38			
	-3,74	-7,31	158,42	158,70		
	-3,75	-7,31	158,97			
	-3,32	-6,89	118,34	106,01		
	-2,98	-6,55	93,67			
G6P	-6,14	-9,71	835,98	811,43	618,51	167,08
	-6,05	-9,62	786,89			
	-5,47	-9,03	524,47	520,99		
	-5,45	-9,02	517,51			
	-5,79	-9,35	654,27	523,11		
	-5,05	-8,61	391,94			

7.6 ANEXO 7: Presupuesto

Tabla 60. Desglose del coste de los equipos.

Equipos			Meses de proyecto		8	
Equipo	Empresa	Coste ud.	Coste ud. + IVA	Uso común	Coste final	
Termociclador	ThermoFisher	8.950,00 €	10.829,50 €	Lab.	111,88 €	
Cámara de electroforesis, complementos y fuente de voltaje	ProLab	11.046,55 €	13.366,33 €	Dep.	27,62 €	
Espectofoómetro UV	QuercusLab	3.155,86 €	3.818,59 €	Dep.	7,89 €	
Step One Plus	Applied Biosystems	11.970,00 €	14.483,70 €	Dep.	29,93 €	
NanoDrop	Thermo Scientific	7.888,74 €	9.545,38 €	Dep.	19,72 €	
Transiluminador para electroforesis	Thermo Scientific	1.285,00 €	1.554,85 €	Dep.	3,21 €	
Kodak EDAS 290	BioRad	6.160,78 €	7.454,54 €	Dep.	15,40 €	
Centrifuga clínica	Tecnylab	726,00 €	878,46 €	Dep.	1,82 €	
Ultracentrifuga Sorvall	Thermo Scientific	60.270,00 €	72.926,70 €	Dep.	150,68 €	
Centrifuga mini 2507/10, 10000 rpm	Tecnylab	272,25 €	329,42 €	Lab.	3,40 €	
Baño térmico	Tecnylab	302,50 €	366,03 €	Lab.	3,78 €	
Campana flujo laminar	Thermo Scientific	4.862,17 €	5.883,23 €	Dep.	12,16 €	
Contador de células	Fisher Scientific	3.430,00 €	4.150,30 €	Dep.	8,58 €	
Incubadora para cultivo	Quirumed	8.290,00 €	10.030,90 €	Dep.	20,73 €	
Incubadora	Fisher Scientific	3.972,33 €	4.806,52 €	Dep.	9,93 €	
Incubadora con agitación	Quirumed	441,12 €	533,76 €	Dep.	1,10 €	
Autoclave	Quirumed	4.811,00 €	5.821,31 €	Dep.	12,03 €	
Estufa de secado	Fisher Scientific	5.075,00 €	6.140,75 €	Dep.	12,69 €	
Total inversión equipos		142.909,30 €	172.920,26 €		452,52	

Equipo	Producto
Termociclador	https://goo.gl/evFccw
Cámara de electroforesis, complementos y fuente de voltaje	https://goo.gl/TjPN7W
Espectofoómetro UV	https://goo.gl/TjPN7W
Step One Plus	https://goo.gl/mK7c5V
NanoDrop	https://goo.gl/Gpd3m5
Transiluminador para electroforesis	https://goo.gl/7f5RSJ
Kodak EDAS 290	
Centrifuga clínica	https://goo.gl/EMYwEC
Ultracentrifuga Sorvall	https://goo.gl/gcPPzk
Centrifuga mini 2507/10, 10000 rpm	https://goo.gl/BYqxxa
Baño térmico	https://goo.gl/12a6iy
Campana flujo laminar	https://goo.gl/FH9BY3
Contador de células	https://goo.gl/DCeGVd
Incubadora para cultivo	https://goo.gl/EyvMeY
Incubadora	https://goo.gl/yX9iL7
Incubadora con agitación	https://goo.gl/5ZFFdN
Autoclave	https://goo.gl/bhNV2g
Estufa de secado	https://goo.gl/QAwsJ6

Tabla 61. Desglose del coste de los reactivos, KITS, enzimas y oligonucleótidos.

Reactivos, KITS, oligonucleótidos, shARNs y células de cultivo				
Reactivo	Empresa	Cantidad	Coste	Coste + IVA
Agarosa de alta resolución	Ecogen	50g	100,00 €	121,00 €
RedSafe™	INtRON Biothecchnology	1ml	90,00 €	108,90 €
Tris	Sigma Aldrich	1kg	148,00 €	179,08 €
Na ₂ EDTA	Sigma Aldrich	500g	96,00 €	116,16 €
Marcador ADN 1kb	Fermentas	250ug	197,00 €	238,37 €
Orange G	Sigma-Aldrich	25g	61,00 €	73,81 €
Glicerol	Sigma –Aldrich	500ml	136,00 €	164,56 €
ADN Polimerasa	Biotools	1000 u	100,00 €	121,00 €
Tampón de reacción 10X	Biotools	1 set	159,00 €	192,39 €
100mM DNTPs Set	Invitrogen	1 set	159,00 €	192,39 €
T4 ADN Ligasa	Promega (USA)	500 u	242,00 €	292,82 €
Tampón de Ligación Rápido 2X	Promega (USA)	1,5 ml	84,00 €	101,64 €
Tampón Tango 10X (con BSA)	Thermo Scientific	5x1,0ml	15,63 €	18,91 €
Yeast Extract	CONDA (Madrid)	250g	56,50 €	68,37 €
Tryptone	CONDA (Madrid)	250g	122,00 €	147,62 €
NaCl	Panreac (Barcelona)		- €	- €
Tampón ECOR1	Thermo Fisher	5 x 1,0 ml	15,67 €	18,96 €
KCl	Sigma Aldrich	500ml	198,00 €	239,58 €
Na ₂ HPO ₄	Panreac	30g	706,00 €	854,26 €
KH ₂ PO ₄	Panreac	90g	1.013,00 €	1.225,73 €
Tripsina	Thermo Fisher	500ml	63,25 €	76,53 €
DMEM	Sigma Aldrich	500ml	22,50 €	27,23 €
Suero bovino	Fisher Scientific	1000ml	1.108,00 €	1.340,68 €
Penicilina y Streptocina	Thermo Fisher	100ml	14,61 €	17,68 €
Tryptan Blue	Sigma Aldrich	20 ml	10,30 €	12,46 €
SYBR Green	Thermo Fisher	5ml	298,00 €	360,58 €
BES	Thermo Fisher	500g	297,22 €	359,64 €
CaCl ₂	Panreac	1L	125,92 €	152,36 €
MgCl ₂	Sigma Aldrich	5ml	24,67 €	29,85 €
M-MLV Transcriptasa Inversa y tampón	Sigma Aldrich	1ml	338,00 €	408,98 €
Random Nonameros	Sigma Aldrich	1ml	114,00 €	137,94 €
Enzimas de restricción				
	Empresa	Cantidad	Coste	Coste + IVA
ACC651	Thermo Fisher	1000 u	43,77 €	52,96 €
Hind III	Thermo Fisher	5000 u	29,64 €	35,86 €
EcoR I	Thermo Fisher	25000u	143,00 €	173,03 €

KITS				
	Empresa	Cantidad	Coste	Coste + IVA
GenElute TM Plasmid Miniprep KIT	Sigma Aldrich	70 purificaciones	111,00 €	134,31 €
GenElute TM Plasmid Midiprep KIT	Sigma Aldrich	35 purificaciones	246,00 €	297,66 €
High Pure ARN Isolation KIT	Roche	50 extracciones	338,35 €	409,40 €
High Pure PCR Product Purification KIT	Roche	250 purificaciones	476,72 €	576,83 €
Oligonucleótidos				
	Empresa	Cantidad	Coste	Coste + IVA
Oligonucleótidos shARNs y	Sigma Aldrich	20	25,07	28,08 €
Bacterias				
E.Coli Alpha E.Coli D115	Thermo Fisher Scientific	0,5ml	395,00 €	477,95 €
Bacterias				
Linea celular 293A	Thermo Fisher Scientific	1x10 ⁷	590,00 €	713,90 €
Total			8.354,82 €	10.107,08 €

Tabla 62. Desglose de coste de servicios y personal.

Coste directo				
	Sueldo mensual por convenio	Meses de proyecto	Horas dedicadas diarias	Total
Ayudante Doctor	25,79 €/hora	8	3	2.475,84 €
Auxiliar de Laboratorio	1.207,74 €/mes	8	8	9.661,92 €
Tutores (x2)	32,06 €/hora	10 horas totales para el proyecto		641,20 €
Coste indirecto				
	Sueldo mensual por convenio	Meses de proyecto	Grupos departamento	Total
Técnico de instrumentos	1.105,72 €	8	10	884,58 €
Servicio de limpieza	917,45 €	8	10	733,96 €
Servicios externos				
	Coste ud. Secuenciada	Secuencias enviadas	Total	
Servicio Científico UB	14,00 €	15	210,00 €	
	Coste mensual aproximado	Meses de proyecto	Total	
Agua	5% total	8		
Electricidad	5% total	8		
Gas	5% total	8		
Total presupuesto	13.966,30 €			